

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-172396

(43)Date of publication of application : 21.06.1994

(51)Int.Cl.

C07K 15/08
A61K 39/012
C07K 13/00
C12N 1/21
C12N 15/30
C12P 21/02
// (C12N 1/21)
C12R 1:19)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 03-022573

(71)Applicant : F HOFFMANN LA ROCHE AG

(22)Date of filing : 24.01.1991

(72)Inventor : BINGER MARY-HELEN

(30)Priority

Priority number : 90 470508 Priority date : 26.01.1990 Priority country : US

(54) RECOMBINANT COCCIDIOSIS VACCINE-5-7 EIMERIA SURFACE ANTIGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a DNA encoding a precursor of an Eimeria merozoite surface antigen having an apparent molecular weight of about 23 kDa, determined by the SDS-PAGE.

CONSTITUTION: A protein having one or more immunoreactive determinant and/or antigen determinant of a surface antigen, a recombinant vector and a recombinant virus containing DNA encoding the protein and a transgenic microorganism containing the vector or the virus, are provided. Preparation methods of the protein and the transgenic microorganism are provided. A purified 23 kDa merozoite surface antigen itself, its 30 kDa precursor itself and a method for protecting poultry from coccidiosis using an Eimeria surface antigen, a precursor protein and/or fragment thereof, are presented. The protein or the fragment can be administered for the purpose of such protection either as a purified protein or in the form of DNA encoding the protein in an appropriate virus vector (e.g. vaccinia virus).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.12.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3023997

[Date of registration] 21.01.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-172396

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 15/08		8517-4H		
A 6 1 K 39/012	A F F	9284-4C		
C 0 7 K 13/00		8517-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数19(全 47 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-22573

(22)出願日 平成3年(1991)1月24日

(31)優先権主張番号 4 7 0 5 0 8

(32)優先日 1990年1月26日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591015728

エフ ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 スイス国 CH-4002 バーゼル, グレ
 ンツァーヘルストラッセ 124-184

(72)発明者 メリー-ヘレン ビンジャー

アメリカ合衆国 ニュージャージー州
 08525, ホーブウェル, コロンビア ア
 ヴェニュー 49

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 組み換えコクシジウム症ワクチン-5-7アイメリア表

面抗原

(57)【要約】 (修正有)

【目的】SDS-PAGEで測定して約23キロダルトンの見掛け分子量を有するアイメリアメロゾイト表面抗原の前駆体をコードするDNAを提供する。

【構成】表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基を1つまたはそれ以上有する蛋白、当該蛋白をコードするDNAを含有する組み換えベクターおよび組み換えウイルス、並びに前記ベクターおよびウイルスを含有する形質転換微生物。前記蛋白および形質転換微生物の作製方法。精製23kDaメロゾイト表面抗原それ自体、その30kDa前駆体形それ自体、およびアイメリア表面抗原、前駆体蛋白および/またはその断片を用いるコクシジウム症から家禽を保護する方法。蛋白および断片は、かかる防御のために精製蛋白としてまたは適当なウイルスベクター(例、ワクシニアウイルス)中の前記蛋白をコードするDNAの形で投与される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アイメリア (Eimeria)メロゾイト表面抗原の免疫反応決定基および／または抗原決定基の1つまたはそれ以上を有する蛋白であって、前記表面抗原がSDS-PAGEで測定して約23キロダルトンの見掛け分子量を有しかつSDS-PAGEで測定して約30キ*

```

M A K S M L S G I V F A G L V A A A A A
S S A N S A A N V S V L E S G P A V Q E
V P A R T V T A R L A K P L L L L S A L
A A T L A A A P L V L Q C P N I I S S N
N Q Q T S V R R L A A G G A C G D E E D
A D E G T S Q Q A S R R R R K P D T P A
A D K Y D F V G G T P V S V T E P N V D
E V L I Q I R N K Q I F L K N P W T G Q
E E Q V L V L E R Q S E E P I L I V A R
T R Q H L K D I L V V S S C T G R K D C

```

*ロダルトンの見掛け分子量を有する前駆体蛋白から誘導されるものである、他のアイメリア蛋白を実質的に含まない上記の蛋白。

【請求項2】 下記アミノ酸配列：

【化1】

またはその部分配列（例えば、上記アミノ酸配列中の最初の20個のアミノ酸残基を実質的に欠いているもの）を有する請求項1記載の蛋白、もしくは前記蛋白の免疫学的特性を実質的に変えることなく欠失、挿入または置換により前記アミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有※20

※するその機能的均等蛋白。

【請求項3】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするDNA。

【請求項4】 下記ヌクレオチド配列：

【化2】

```

ATGGCTAAGTCTATGCTTTCTGGAATTGTTTGTGCTGGTCTGTTGCTGCTGCAGCGGCC
AGTTCGGCCAAACAGCGCCGCCAACGTCTCCGTTTTGGAGAGTGGGCCCGCTGTGCAGGAA
GTGCCAGCGCGCACGGTCACAGCTCGCCTGGCGAAGCCTTTGCTGCTTCTTTCTGCTCTT
GCTGCGACTTTGGCAGCAGCTTTCCTCGTTTTGCAATGCTTCAACACCATCTCCAGCAAC
AACCAGCAAACCAGCGTCAGGAGACTGCGCGCCGGAGGTGCATGCGGAGATGAGGAAGAT
GCAGATGAGGGAACCTTACAGCAGGCCAGCCGGAGGAGAGAAAACCTGATACCCCTGCA
GCAGATAAATACGATTTTGTGGCGGAACCTCCAGTTTCGGTCACTGAGCCGAATGTTGAT
GAAGTCCTTATCCAAATTAGAAATAACAAATCTTTTGAAGAACCCATGGACTGGACAA
GAAGAACAAGTTCTAGTACTGGAACGACAAAGTGAAGAACCCATTCTGATTGTGGCGAGG
ACAAGACAACACTTGAAGGATATCTTGGTAGTCAGCTCTTGACAGGACGGAAGACTGC

```

TAA

の全部または一部を有する、請求項1または2に記載の蛋白をコードするDNAまたはその機能的均等物。

【請求項5】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなり、適合性の宿主生物内で該DNAの発現を指示しうる組み換えベクター。

【請求項6】 請求項1または2に記載の蛋白をコード

するヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなり、適合性の宿主生物内で該DNAの発現を指示しうる組み換えウイルス。

【請求項7】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなる組み換えベクターを含有し、該DNAを発現しうる形質転換微生物。

【請求項8】 コクシジウム症に対して家禽を免疫感作するための請求項1または2に記載の蛋白。

【請求項9】 請求項1または2に記載の蛋白を生産する方法であって：

(a) 該蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを包含する組み換えベクターを保有する微生物を、該DNAが発現される条件下で培養し；そして

(b) この培養物から前記蛋白または断片を単離することを含んで成る方法。

【請求項10】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを包含する組み換えベクターを作製する方法であって：

(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAをベクターに挿入し；

(b) 該ベクターを微生物内で複製させ；そして

(c) その微生物から組み換えベクターを単離することを含んで成る方法。

【請求項11】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを包含する組み換えウイルスを作製する方法であって：

(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを、ウイルスの成熟および感染力を阻害することなくウイルスゲノムに挿入し；

(b) 前記組み換えウイルスを細胞培養物内で増幅させ；そして

(c) 培地から組み換えウイルスを精製する、ことを含んで成る方法。

【請求項12】 請求項1または2に記載の蛋白を生産しうる形質転換微生物を作製する方法であって：

(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを包含する組み換えベクターで微生物を形質転換し；そして

(b) 該形質転換微生物を醗酵プロセス中で増殖させる、ことを含んで成る方法。

【請求項13】 請求項1または2に記載の蛋白および生理学的に許容しうる担体またはアジュバントを含んでなる、コクシジウム症から家禽を保護するためのワクチン。

【請求項14】 請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを包含しかつ適合性の宿主生物内で該DNAの発現を指示しうる組み換えウイルス、および生理学的に許容しうる担体またはアジュバントを含有する、コクシジウム症から家禽を保護するためのワクチン。

【請求項15】 コクシジウム症から家禽を保護しうるワクチンを製造するための請求項1または2に記載の蛋白の使用。

【請求項16】 請求項9に記載の方法により生産された、請求項1または2に記載の蛋白。

【請求項17】 請求項10に記載の方法により作製さ

れた、請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなる組み換えベクター。

【請求項18】 請求項11に記載の方法により作製された、請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなる組み換えウイルス。

【請求項19】 請求項12に記載の方法により作製された、請求項1または2に記載の蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含んでなる組み換えベクターを含有する形質転換微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は寄生性のアイメリア (*Eimeria*) 原虫の抗原に関する。これら抗原は、コクシジウム症から家禽を保護するために種々の投与経路により使用できる。

【0002】

【従来の技術】コクシジウム症はアイメリア属の寄生性細胞内原虫によって引き起こされる家禽の疾病である。この疾病は大規模な集約的家禽飼育施設に特有の病気である。化学療法によってこの疾病を防ぐための概算費用はアメリカ合衆国だけで毎年1億ドルを超える。既知の抗コクシジウム薬に対する耐性の出現が絶えず新薬の開発を必要としているが、新薬の開発にはますます費用がかかるようになってきており、しかも食用動物中の残留薬剤に対する消費者の許容範囲が次第に狭まりつつある。

【0003】自然のコクシジウム症感染に対する防御免疫は十分に文献中で実証されている。少数の生存性オーシストを数週間にわたって毎日管理投与すると、通常の毒性量のチャレンジ感染に対して完全な免疫が賦与されることが示されている (Roseら, *Parasitology*73:25 (1976); Roseら, *Parasitology*88:199 (1984))。感染に対する抵抗が獲得されたことの証明により、ひな鳥に免疫を誘導するワクチン製造の可能性が示唆され、これはコクシジウム化学抑制剤の必要性を回避するものであった。実際に、この種の概念は Sterwin Laboratories (Opelika, AL) の Coccivac (登録商標) 配合物において試験されている。

【0004】コクシジウム症のワクチンを製造する目的で、Murrayらの欧州特許出願公開第167,443号は、アイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*) のスポロゾイトまたは孢子形成オーシストから少なくとも15種類のポリペプチド (これらの多くはスポロゾイトの表面に関連する) を含有する抽出物を調製した。これらの抽出物をニワトリに注射すると、毒性E・テネラの孢子形成オーシストを経口接種させた後の盲腸病変が軽減された。

【0005】比較的最近になって、Schenkelらの米国特

許第4, 650, 676号は、E. テネラのメロゾイトに対するモノクローナル抗体の生産を開示した。これらの抗体を用いて、Schenkelらはこれら抗体に対する抗原を数多く同定した。E. テネラのスポロゾイトをこれらの抗体とブレインキューベートし、次に処理済のスポロゾイトをニワトリの盲腸に導入することにより、Schenkelらは盲腸病変の程度を未処理スポロゾイト対照と比べて若干低下させることができた。

【0006】組み換えDNA方法を用いて、Newmanら（欧州特許出願公開第164, 176号）はアイメリア・テネラから25, 000ダルトン抗原をコードするスポロゾイト期からの遺伝子をクローニングした。死滅したE. テネラスポロゾイトを用いる反復免疫感作により免疫したニワトリからの血清は、ヨウ素化スポロシストおよびスポロゾイト膜調製物からこの抗原を免疫沈降させた。より最近、Jenkins Nucleic Acids Res. 16:9863 (1988) はアイメリア・アセルブリナ (*Eimeria acervulina*) からの250, 000ダルトンのメロゾイト表面蛋白の一部をコードするcDNAについて記載している。このcDNAの発現産物はこの生物に対する抗血清により認識された。

【0007】組み換えDNA技術の進歩により別のアプローチ、すなわちサブユニットワクチン、が利用可能となった。かかるサブユニットワクチンの例は、例えば欧州特許出願公開第324648号、同第337589号および同第344808号に記載されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で測定して約23キロダルトンの見掛け分子量を有し、かつSDS-PAGEで測定して約30キロダルトンの見掛け分子量を有する前駆体蛋白から誘導されるアイメリアメロゾイト表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基の1つまたはそれ以上を有する精製蛋白を提供する。これらの蛋白は他のアイメリア蛋白を実質的に含まない。

【0009】より詳細には、本発明は、SDS-PAGEで測定して約23キロダルトンの見掛け分子量を有するアイメリアメロゾイト表面抗原から成る単離蛋白および該蛋白の断片を提供する。これらの蛋白および断片は他のアイメリア蛋白を実質的に含まない。本発明はさらに、SDS-PAGEで測定して約30キロダルトンの見掛け分子量を有し、かつ図1に示されるアミノ酸配列を有する、前記アイメリアメロゾイト表面抗原の前駆体蛋白から成る蛋白またはその断片を提供する。該前駆体蛋白は他のアイメリア蛋白を実質的に含まない。

【0010】本発明の好適な蛋白は、図1に示されるアミノ酸配列を有するがN末端のシグナルペプチド配列（このシグナルペプチド配列は図1に示される配列中の最初の20個のアミノ酸から実質的に成る）を欠く成熟

アイメリアメロゾイト表面抗原蛋白である。本発明はまた、前記蛋白の免疫学的性質を実質的に変えることなく欠失、挿入または置換により前記アミノ酸配列と関連するアミノ酸配列を有するその機能的同等蛋白にも関する。

【0011】本発明はさらに、約23キロダルトンの見掛け分子量を有するアイメリアメロゾイト表面抗原または先に述べたその前駆体蛋白の全部または一部をコードするDNA、前記DNAを含有しかつ適合性の宿主生物内で前記DNAの発現を指示しうる組み換えベクター、およびかかるベクターを含有する微生物をも提供する。

【0012】本発明はさらに、約23キロダルトンの見掛け分子量を有するアイメリアメロゾイト表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基の1つまたはそれ以上を有する蛋白を生産する方法であって、(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNA（例えば、図1に示されるヌクレオチド配列を有するDNA）またはその断片を含んでなる組み換えベクターを含有する微生物を、該DNA配列または断片が発現される条件下で培養し；そして(b) この培養物から前記蛋白を単離する、ことを含んで成る方法をも提供する。

【0013】本発明はさらに、本発明蛋白の1種またはそれ以上の有効量および生理学的に許容しうる担体を含む、コクシジウム症から家禽を保護するためのワクチンを提供する。本発明はさらに、本発明蛋白をコードするDNA配列を含有しかつ該DNA配列を発現させることができる組み換えウイルスおよび生理学的に許容しうる担体を含む、コクシジウム症から家禽を保護するためのワクチンをも提供する。

【0014】本発明はさらに、コクシジウム症にかかりやすい若い家禽に有効量の本発明ワクチンを投与することから成る、コクシジウム症から家禽を保護する方法をも提供する。本発明のアイメリア蛋白は、コクシジウム症の原因生物に対して免疫を獲得した動物の血清に含まれる抗体を用いて同定されたので、重要なワクチン抗原である。このために、これらの蛋白はコクシジウム症からの家禽の保護において重要な役割を演ずる可能性が高い。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は図面を参照することによって一層理解しやすくなるであろう。図1は、ウサギ由来の抗体選別した抗体と免疫ニワトリ血清により認識されるアイメリア前駆体蛋白をコードする1.2 kbのcDNA分子のヌクレオチド配列を示す。図1から分かるとおり、該前駆体蛋白をコードするヌクレオチド配列はヌクレオチド68のATGとヌクレオチド668の停止コドンTAAの間に含まれる（200個のアミノ酸をコードする）。図1はまた提示されたヌクレオチド配列から予測されるアイメリア前駆体蛋白のアミノ酸配列も示す。ヌクレオチドおよびアミノ酸を表すのに標

準一文字略号が用いられる。これらの略号の意味は、Lehninger, Principles of Biochemistry, 1984, Worth Publishers, Inc., New York, p.96, 798 のような標準的な生化学の書物に記載されている。

【0016】図2は、種々のアイメリアメロゾイト蛋白のSDS-PAGE分析の結果を示す。パネルAは対照(a)または抗体選別した抗体(b)を用いて検索した全メロゾイト蛋白のイムノブロットである。パネルA中の矢印は約23キロダルトンの分子量を有する蛋白を含むバンドの位置を示す。パネルBは対照(a)または抗体選別した抗体(b)で免疫沈降した¹²⁵I-表面標識メロゾイト蛋白のオートラジオグラムである。パネルCはメロゾイトmRNAのインビトロ翻訳により作製された生産物の完全混合物(a)、およびラムダ5-7クローンを用いて選別した抗体(b)、抗メロゾイト血清と反応性の蛋白を生産する別のファージクローンをを用いて選別した抗体(c)および非組み換えファージを用いてメロゾイト血清から選別した対照抗体(d)を用いて免疫沈降させた翻訳産物を示す。バンドはフルオロ*

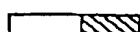
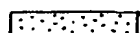
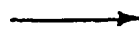

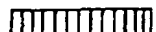


* グラフィーにより可視化した。キロダルトン(kDa)で示した分子量をもつ分子量マーカーの位置を図面の右側に示す。

【0017】図3は、PvuII(レーン1)、HincII(レーン2)、PstI(レーン3)、SphI(レーン4)またはSacI(レーン5)を用いて消化したアイメリア・テネラの胞子形成オーシストのゲノムDNAのサザンブロット分析の結果を示す。kbで示した大きさをもつ標準DNAの位置を図面の右側に示す。

10 【0018】図4は、プラスミドpDS56/RBSIIの模式図を示す。この図および図6、8、10において、略号および記号B、Bg、E、H、N、P、S、XおよびXbはそれぞれ制限酵素BamHI、BglII、EcoRI、HindIII、NcoI、PstI、SalI、XhoIおよびXbaIの切断位置を示す。

【0019】

【化3】

 は調節可能なプロモーター/オペレーター要素N25OPSN25OP29を表す;  はリボソーム結合部位RBSII、RBSII(-1)およびRBSII(-2)を表す;  はこれらのリボソーム結合部位の支配下にあるコード領域を表す;  は6個のヒスチジン残基をコードする領域を表す;  はターミネーターt。およびT1を表す;  はイー・コリ(E.coli)内でのDNA複製に必要な領域(repl.)を表す;  はジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(cat)、β-ラクタマーゼ(bla)、lacリプレッサー(lacI)およびネオマイシンホストトランスフェラーゼ(neo)のコード領域を表す。

【0020】図5は、プラスミドpDS56/RBSIIの全ヌクレオチド配列を示す。この配列には、図4で示される制限酵素の認識配列が示してある。示したアミノ酸配列はリボソーム結合部位RBSIIの支配下にあるオープン・リーディング・フレームを表す。図6は、プラスミドpDS56/RBSII(-1)の模式図を示す。

【0021】図7は、プラスミドpDS56/RBSII(-1)の全ヌクレオチド配列を示す。この配列には、図6に示される制限酵素の認識配列が示してある。

示したアミノ酸配列はリボソーム結合部位RBSII(-1)の支配下にあるオープン・リーディング・フレームを表す。図8は、プラスミドpDS56/RBSII(-2)の模式図を示す。

【0022】図9は、プラスミドpDS56/RBSII(-2)の全ヌクレオチド配列を示す。この配列には、図8に示される制限酵素の認識配列が示してある。示したアミノ酸配列はリボソーム結合部位RBSII(-2)の支配下にあるオープン・リーディング・フレームを表す。図10は、プラスミドpDMI.1の模式

図を示す。

【0023】図11は、プラスミドpDMI.1の全ヌクレオチド配列を示す。この配列には、図10に示される制限酵素の認識配列が示してある。示したアミノ酸はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(MetからPheまで)およびlacリプレッサー(MetからGlnまで;この遺伝子の逆方向に留意されたい)をコードするオープン・リーディング・フレームを包含する。

【0024】ここに引用したすべての文献は参照としてそのすべてがここにとり込まれるものとする。本明細書中で用いられる以下の用語は次の意味をもつものとする:「アイメリア表面抗原」はアイメリア・テネラのメロゾイト期に存在する、SDS-PAGEで測定して約23キロダルトンの見掛け分子量を有する蛋白を意味する。この蛋白は図1に示されるヌクレオチド配列を有する遺伝子のインビボ発現産物の翻訳後プロセッシングにより生成されると考えられる。

【0025】「前駆体蛋白」はSDS-PAGEで測定して約30キロダルトンの見掛け分子量を有する蛋白を意味する。この蛋白はインビボ蛋白分解によりアイメリア表面抗原にプロセッシングされると考えられる。この蛋白をコードするcDNA分子のヌクレオチド配列およびそれから予測されるアミノ酸配列を図1に示してある。

【0026】「アイメリア表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基の1つまたはそれ以上を有する蛋白」という表現は、免疫学的にコンピテントな宿主生物に免疫応答を惹起させることができおよび/または相補的抗体に特異的に結合することができ、そして前記定義したアイメリア表面抗原のエピトープに相当する領域またはエピトープを1つまたはそれ以上有する蛋白を意味する。前記蛋白は図1のヌクレオチド配列の機能的同等物によりコードされうる。これらの機能的同等蛋白は、免疫学的活性を実質的に変えない(すなわち、免疫反応決定基および/または抗原決定基を実質的に破壊しない)アミノ酸置換により図1の配列と関連するアミノ酸配列をもっている。

【0027】遺伝暗号の縮重ゆえに、図1に示されるアミノ酸配列をコードしうるヌクレオチド配列(機能的同等物)は多数存在しうることが理解されよう。また、ベクターに挿入された本発明のDNA配列および断片のヌクレオチド配列は、かかる配列または断片を含有する組み換えベクターが適当な宿主生物内でアイメリア表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基の1つまたはそれ以上を有する蛋白もしくは断片の生産を指示しうる限り、実際の構造遺伝子の部分でないヌクレオチドを包含しうることも理解されよう。

【0028】蛋白の生物学的および免疫学的活性を実質的に変えないアミノ酸置換が起こることは知られており、例えば Neurathら, "The Proteins", Academic Pre

ss, New York (1979)、特に14頁の図6、に記載されている。最もしばしば観察されるアミノ酸置換はAla/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, およびこれらの逆である。

【0029】本発明具体例のかかる機能的に同等なヌクレオチド配列変更およびアミノ酸置換は、生成する蛋白がここに定義されるアイメリア表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基の1つまたはそれ以上を保有する限り、本発明の範囲内にある。図1のアミノ酸配列または置換により関係づけられたアミノ酸配列をコードする他のDNA配列は、Morinagaら, Biotechnology 2:636 (1984) に記載されるように、本発明の例示cDNA(図1)に対するプライマー指示部位特異的突然変異誘発により、適当な合成オリゴヌクレオチドを用いて簡単に作製することができる。

【0030】「断片」なる用語は本発明のcDNAまたは蛋白の1つのサブ配列から成るオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。かかる断片はDNAに対しては制限エンドヌクレアーゼを、蛋白に対してはプロテアーゼを使って、より大きい分子を酵素的に切断することにより生成できる。しかしながら、本発明の断片は酵素切断産物に限定されず、末端が酵素切断点に一致しないサブ配列をも包含する。かかる断片は、例えば化学合成により、ここに示した配列データを用いて作ることができる。また、DNA断片は単離したメッセンジャーRNA(mRNA)から不完全な相補的DNA(cDNA)合成により作ることでもできる。蛋白断片はまたその蛋白断片をコードするDNA断片を発現させることによっても作製できる。かかる蛋白断片は、それらが免疫反応決定基および/または抗原決定基を構成するに足る数のアミノ酸残基を含有する場合に、本発明において有用でありうる。一般には、少なくとも約7個か8個の残基が必要である。以下で説明するように、かかる断片を免疫反応性となすためには、それらを免疫原性のあるキャリアー分子に結合させることが必要であるかもしれない。

【0031】本発明の蛋白は組み換えDNA技術、化学合成またはアイメリア調製物からの単離のような当分野で知られた方法により作ることができる。本発明蛋白を作るために必要とされるDNAは、図1に示されるヌクレオチド配列情報を用いて化学的に合成できよう。かかる化学合成はMatteucciら, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981) により開示されるホスホルアミダイト固形支持体法のような任意の既知方法を用いて実施できる。

【0032】あるいはまた、cDNAはアイメリアmRNAから作ることでもできる。メッセンジャーRNAは標

準技法を使ってアイメリアメロソイトから単離できる。これらのmRNAサンプルを用いて、Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY に記載されるようにして二本鎖cDNAを作ることができる。このcDNAは次に、E.コリの形質転換に使用できる適当なクローニングベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製することができる。

【0033】cDNAライブラリーを次に本発明のクローニング遺伝子またはその断片をプローブとして用いてスクリーニングすることができる。かかる遺伝子または断片は、プローブとして使用するには、例えば4種類のデオキシリボヌクレオチド（これらのうちの1種は α 位置に 32 Pを含有）の存在下にPol DNAポリメラーゼを用いてニックトランスレーションすることにより放射性標識できる（Maniatisら, 前出, p.109）。これらプローブはまたアイメリア表面抗原のcDNAの既知配列に基づくオリゴヌクレオチド合成によっても作製できる。

【0034】以下の実施例ではmRNA源としてアイメリア・テネラを使用した。この種からのクローニング遺伝子は、様々な種間のDNA配列相同性ゆえに、他のアイメリア種からの遺伝子を単離するためのプローブとして使用できる。本発明のアイメリアDNA配列は、ひとたび同定されて単離されると、挿入した遺伝子配列の転写および翻訳に必要な要素を含有する適当な発現ベヒクルに挿入される。有用なクローニングベヒクルは染色体、非染色体および合成DNA配列のセグメントから成ることができ、例えばいろいろな既知の細菌プラスミド、ファージDNA、プラスミドとファージDNAの組み合わせ（例、ファージDNAまたは他の発現制御配列を用いるために修飾されたプラスミド）、もしくは酵母プラスミドである。使用しうる詳細なクローニングベヒクルには、それらに制限されるわけではないが、pEV-vrfプラスミド（pEV-vrf.1, -2および-3; Crowl 他, Gene 38:31 (1985) に記載されている）; SV40; アデノウイルス; 酵母; ラムダgt-WES-ラムダB; Charon 4A および 28; ラムダgt-1-ラムダB; M13由来ベクター、例えばpUC8, 9, 18および19, pBR313, 322および325; pAC105; pVA51; pACY177; pKH47; pACYC184; pUB110; pMB9; colE1; pSC101; pML21; RSF2124; pCR1またはRP4; 鶏痘ウイルス; ワクシニアウイルス; ヘルペスウイルス群の一員、が含まれる。

【0035】クローニングベクターへのアイメリア遺伝子の挿入は、この遺伝子と所望のクローニングベヒクルがともに同一の制限酵素で切断された場合、相補性DNA末端が形成されるので、容易に達成される。これによ

り達成できない場合は、一本鎖DNAを消化して平滑末端とするか、あるいは一本鎖末端を適当なDNAポリメラーゼを用いて充填して同一の結果を得ることにより、切断した末端を修飾することが必要であろう。この方法では、T4 DNAリガーゼのような酵素による平滑末端の連結を実施できる。あるいはまた、DNA末端にヌクレオチド配列（リンカー）を連結することにより所望の任意の部位を生成させることもできる。かかるリンカーは制限部位認識配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列を含有しうる。また、切断したベクターおよびアイメリア遺伝子または断片は、Morrow Methods in Enzymology 68:3 (1979) に記載されるようにホモポリマーテイルングにより修飾することもできる。

【0036】本発明で使用できるクローニングベヒクルの多くは、所望の形質転換体の選択に使用しうるマーカー活性、例えばpBR322中のアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性、pUC8中のアンピシリン耐性および β -ガラクトシダーゼ活性、並びにpEV-vrfプラスミド中のアンピシリン耐性、の1種またはそれ以上を含有する。かかるベクターが挿入された宿主細胞の選択は、宿主細胞がそれ以外はベクターにより与えられる活性を欠く場合に非常に単純化される。

【0037】クローニングベヒクル中の選択された部位に挿入されるアイメリア遺伝子のヌクレオチド配列は実際の構造遺伝子の部分でないヌクレオチドを包含しうることは理解されるべきである。また、その遺伝子は完全な野生型遺伝子の部分のみを含んでいてもよい。必要とされていることの全ては、クローニングベヒクルへ挿入後の遺伝子断片がアイメリア表面抗原の免疫反応決定基および/または抗原決定基を少なくとも1つ有するポリペプチドまたは蛋白の適当な宿主生物内における生産を指示できるということである。従って、本発明蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含有する組み換えベクターは、

(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAをベクターに挿入し;

(b) 該ベクターを微生物内で複製させ; そして

(c) その微生物から組み換えベクターを単離することにより作製できる。

【0038】適切な宿主生物の選択は当分野で知られた多くの要因に影響される。これらの要因には、例えば選ばれたベクターとの適合性、ハイブリッドプラスミドによりコードされる蛋白の毒性、所望の蛋白の回収容易性、発現特性、生物学的安全性、費用などが含まれる。これらの要因のバランスが考慮されねばならず、また全ての宿主が特定の組み換えDNA分子の発現に等しく効果的というわけではないことも理解されねばならない。

【0039】本発明で使用しうる好適な宿主微生物には、それらに限定されるわけではないが、植物、哺乳類または酵母細胞、および細菌例えばエシエリヒア・コリ

(*Escherichia coli*)、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、アクチノミセス属 (*Actinomyces*) が包含される。エシエリヒア・コリ MC 1061 株 [Casadaban ら, *J. Mol. Biol.* 138:179 (1980) に記載されている]、またはプラスミド pRK248cIts を含有する他の E. コリ K-12 株が使用できる。他の E. コリ K-12 株に使用されるプラスミド pRK248cIts は Bernhard ら *Meth. of Enzymol.* 68:482 (1979) により記載されており、そしてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから寄託番号 ATCC 33766 の下に入手できる。E. コリ MC 1061 株は例えば CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から市販されており、またアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから寄託番号 ATCC 53338 の下に入手できる。E. コリ M15 株に用いるプラスミド pDM1. 1、pDS56/RBSI I、-1 または -2 は以下で述べることにする。

【0040】宿主細胞への組み換えクロニングベクターの移入はいろいろな方法で実施できる。選択されたベクター/宿主細胞系に応じて、かかる移入は形質転換、形質導入またはトランスフェクションにより行われる。ひとたびかかる修飾宿主細胞が作製されると、その細胞を培養して、培養物から蛋白発現産物を単離できる。

【0041】アイメリア表面抗原の前駆体蛋白を生産する形質転換体クローンは、E. テネラのグルタルアルデヒド固定スポロゾイトまたはメロゾイトに対して免疫した動物からの血清を用いてスクリーニングすることにより同定される。以下の実施例では、遺伝子産物のスクリーニングおよび特性決定にウサギ抗メロゾイト血清が使用された。免疫ニワトリ血清を用いる免疫学的スクリーニングを並行して行くと、メロゾイト表面抗原をコードする cDNA が独立して単離された。

【0042】免疫学的スクリーニングまたは免疫沈降に使用する抗血清の特異性は、Hall ら *Nature* 311:379 (1984) の抗体選別法の変法を用いて高めることができる。この方法では、以下で詳しく説明するが、クローンにより生産されたアイメリア蛋白に特異的な抗体がフィルターに吸着される。アイメリア抗原産生性クローンの検出は、文献に記載されている免疫沈降、酵素結合免疫アッセイおよびラジオ免疫アッセイ技法を含めた既知の標準アッセイ法を用いて達成できる [例えば、Kennet ら (編), *Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, 1980, Plenum Press, New York, p.376-384 を参照]。

【0043】大量の組み換えアイメリア蛋白は、このようにして得られた形質転換微生物を、必要な栄養素を含有する醗酵プロセス中で組み換え DNA の発現に適した条件下に増殖させることにより生産できる。E. コリによ

り生産される場合、組み換えアイメリア蛋白は細胞質の中または封入体の中に存在する。従って、この蛋白を遊離させるためには、細菌の外層膜を破壊する必要がある。これは超音波処理によるか、あるいは他の機械的破壊手段、例えばフレンチ加圧型セルまたはガウリンホモジナイザーを用いて達成できる [Charm ら, *Meth. Enzymol.* 22, 476-556 (1971)]。

【0044】細胞破壊は化学的もしくは酵素的手段によっても達成できる。2価カチオンはしばしば細胞膜の保全に必要とされるので、EDTA または EGTA のような適当なキレート化剤での処理は細胞からの蛋白の漏出を促進させるに充分に破壊的であることが判明しよう。同様に、リゾチームのような酵素も同じ結果を得るために使用されている。この酵素は細胞壁のペプチドグリカン主鎖を加水分解する。

【0045】さらに、浸透ショック法の適用も採用できる。簡単に説明すると、これは初めに細胞を高張溶液 (細胞から水を失わせ、収縮させる) の中に入れ、その後低張 "ショック" 溶液の中に入れて、細胞への急激な水の流入を起こさせ、所望の蛋白を放出させることにより達成される。ひとたび細胞から遊離されると、アイメリア蛋白は硫酸ナトリウムまたはアンモニウムのような塩による沈殿、限外濾過または当分野でよく知られた他の方法により濃縮できる。更なる精製は、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、分離用ディスクゲル、カーテン電気泳動、等電点電気泳動、低温有機溶剤分画化、または向流分配を含めた慣用の蛋白精製技法により達成できようがそれらに限定されるわけではない。精製はイムノアフィニティークロマトグラフィーによっても行うことができる。

【0046】生物からアイメリア蛋白を精製するための詳細な方法は当分野で知られている。例えば、Newman らの欧州特許出願公開第 164176 号を参照されたい。本発明の蛋白またはその断片は独占的固相合成、部分的固相法、断片縮合または古典的溶液合成のような適当な方法により化学的に合成することもできる。Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963) に記載の固相合成が好適である。

【0047】かかる合成は α -アミノ末端で保護されたアミノ酸を用いて実施される。不安定な側鎖をもつ三官能性アミノ酸も、ペプチド製造中にその部位で化学反応が起こるのを阻止する適当な基で保護される。 α -アミノ保護基はアミノ末端で後続の反応を行わせるために選択的に除去される。 α -アミノ保護基の除去条件は側鎖保護基の除去を引き起こさないものである。

【0048】 α -アミノ保護基は段階的ペプチド合成の分野において有用であることが知られているものである。アシル型保護基 (例、ホルミル、トリフルオロアセチル、アセチル)、芳香族ウレタン型保護基 (例、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、置換ベンジルオキシ

カルボニル)、脂肪族ウレタン保護基(例、*t*-ブチルオキシカルボニル(Boc)、イソプロピルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル)およびアルキル型保護基(例、ベンジル、トリフェニルメチル)が包含される。好適な保護基はBocである。Tyrのための側鎖保護基にはテトラヒドロピラニル、*t*-ブチル、トリチル、ベンジル、Cbz、4-Br-Cbzおよび2, 6-ジクロロベンジルが包含される。Tyrの好適な側鎖保護基は2, 6-ジクロロベンジルである。Aspのための側鎖保護基にはベンジル、2, 6-ジクロロベンジル、メチル、エチルおよびシクロヘキシルが包含される。Aspの好適な側鎖保護基はシクロヘキシルである。ThrおよびSerのための側鎖保護基にはアセチル、ベンゾイル、トリチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、2, 6-ジクロロベンジルおよびCbzが包含される。ThrおよびSerの好適な側鎖保護基はベンジルである。Argのための側鎖保護基にはニトロ、Tos、Cbz、アダマンチルオキシカルボニルまたはBocが包含される。Argの好適な保護基はTosである。Lysの側鎖アミノ基はCbz、2-Cl-Cbz、TosまたはBocで保護することができる。2-Cl-Cbz基がLysの好適な保護基である。側鎖保護基の選択は下記のことに基づいている:すなわち、側鎖保護基はカップリングの期間中無傷で残存しそしてアミノ末端保護基の脱保護期間中またはカップリング条件期間中には切断されない。側鎖保護基は最終ペプチドの合成が完了すると、その標的ペプチドを変更しない反応条件を用いて除去できなければならない。

【0049】固相合成は通常 α -アミノ保護(側鎖保護)アミノ酸を適当な固形支持体にカップリングさせることによりカルボキシ末端から実施される。クロロメチル化またはヒドロキシメチル樹脂に結合させる場合はエステル結合が形成され、生成する標的ペプチドはC末端に遊離のカルボキシル基を有しよう。あるいはまた、ベンズヒドリルアミンまたは*p*-メチルベンズヒドリルアミン樹脂が用いられる場合は、アミド結合が形成され、生成する標的ペプチドはC末端にカルボキサミド基を有しよう。これらの樹脂は市販されており、それらの製法はStewartら, "Solid Phase Peptide Synthesis" (第2版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL., 1984)に記載されている。

【0050】側鎖をTosで、そして α -アミノ官能基をBocで保護したC末端アミノ酸Argは、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミドおよびカルボニルジイミダゾールを含めた種々の活性化剤を用いて、ベンズヒドリルアミン樹脂にカップリングさせる。樹脂支持体に結合後、 α -アミノ保護基を0-25°Cの温度でジオキサン中のトリフルオロ酢酸(TFA)またはHClを用いて除去する。起こりうるS-アルキル化を抑制するためにメ

チオニン(Met)の導入後にジメチルスルフィドをTFAに加える。 α -アミノ保護基の除去後、残りの保護アミノ酸を必要な順序で逐次カップリングさせて所望のペプチド配列を得る。

【0051】カップリング反応には、DDC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-(ジメチルアミノ)-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)およびDCC-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)を含む種々の活性化剤を使用できる。それぞれの保護アミノ酸は過剰量(>2.5当量)で使用され、カップリングは通常DMF、CH₂Cl₂、またはそれらの混合物中で実施される。カップリング反応の完結の程度は、Kaiserら Anal. Biochem. 34:595 (1970)により記載されたニンヒドリン反応により各段階で監視される。不完全なカップリングが判明した場合は、そのカップリング反応を繰り返す。カップリング反応はVega 250, Applied Biosystems シンセサイザーまたは他の市販の装置を用いて自動的に行うことができる。標的ペプチドの全合成後、ペプチド-樹脂をTFA/ジチオエタンを用いて脱保護し、次にペプチドを樹脂から切断しかつ全ての側鎖保護基を除去する液体HFのような試薬を用いて0°Cで1-2時間処理する。

【0052】固形支持体上での側鎖-側鎖環化は、酸性アミノ酸(例、Asp)および塩基性アミノ酸(例、Lys)の側鎖官能基の選択的開裂を可能にするオルソゴナル・プロテクション・スキーム(orthogonal protection scheme)の使用を必要とする。Aspの側鎖のための9-フルオレニルメチル(OFm)保護基およびLysの側鎖のための9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)保護基がこの目的に使用できる。これらの場合、Boc-保護ペプチド-樹脂の側鎖保護基はDMF中のピペリジンを用いて選択的に除去できる。環化はDCC、DCC/HOBTまたはBOPを含む種々の活性化剤を用いて固形支持体上で達成される。HF反応が先に述べたようにして環化ペプチド-樹脂に対して実施される。

【0053】合成蛋白の精製は組み換え法により生産された蛋白について前記したようにして実施できる。アイメリア蛋白はさらに、生物から、膜蛋白の抽出物から回収することもできる。かかる方法により完全な野生型蛋白が生産ができる。この目的に用いられるモノクローナル抗体は、合成または天然のアイメリア蛋白を抗原として用いて、Kohler および Milstein Nature 256:495 (1975)に記載されるようにして作製することができる。これらの方法は本発明の23kdアイメリア表面抗原を精製するのに使用できる。

【0054】本発明のアイメリア蛋白の1種またはそれ以上を、この蛋白と生理学的に許容しうる担体とを含むワクチンに製剤化できる。好適な担体には例えば中

性pHの0.01-0.1Mリン酸緩衝液または生理食塩液が含有される。コクシジウム症に対する免疫は2通りの方法の1つを用いて増強しうる。第一の方法では、ワクチンにアジュバントまたは免疫強化剤を添加できる。第二の方法では、本発明の蛋白をより大きい形態で、架橋複合体としてまたはキャリアー分子に結合させた形態のいずれかで、免疫しようとする動物に投与できる。

【0055】動物のワクチン接種に適するアジュバントには、それらに限定されるわけではないが、アジュバント65（ビーナッツ油、マンニドモノオレエートおよびアルミニウムモノステアレートを含む）；無機物ゲル（例、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ミョウバン）；界面活性剤（例、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リソレシチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、N、N-ジオクタデシル-N', N'-ビス（2-ヒドロキシメチル）プロパンジアミン、メトキシヘキサデシルグリセロール、ブルロニックポリオール）；ポリアニオン類（例、ヒラン、デキストラン硫酸、ポリIC、ポリアクリル酸、カルボボール）；ペプチド（例、ムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシン）；および油エマルジョンが包含される。本発明蛋白はまた、リボソームまたは他のマイクロキャリアー内に封入させた後で投与することもできる。

【0056】リボソームまたは他のマイクロキャリアーへの封入は、ワクチンの放出を長時間にわたり持続できる手段を提供する。Alza浸透ポンプのようなポンプがこの目的に使用できよう。本発明の蛋白（特に、比較的小さい断片）の免疫原性は、架橋することにより、あるいは免疫原性キャリアー分子（すなわち、宿主動物に免疫応答を独立して惹起させる性質を有する巨大分子；この分子に本発明の蛋白および蛋白断片が共有結合できる）に結合させることにより増強できる。架橋またはキャリアー分子への接合は、小さな蛋白断片が時々ハブテン（抗体と特異的に結合できるが、抗体生産を惹起できない分子；すなわち、それらは免疫原性がない）として作用するので必要でありうる。免疫原性キャリアー分子へのかかる断片の接合によりその断片に免疫原性が付与され、このことは一般に「キャリアー効果」として知られている。

【0057】適当なキャリアー分子には例えばポリペプチド、多糖類、リボ多糖類等のような蛋白および天然または合成高分子化合物が包含される。有用なキャリアーはQuil Aと呼ばれるグリコシドであり、これは Moreinら Nature 308:457 (1984)に記載されている。キーホールリンベット（keyhole limpet）ヘモシアニン、ヒトまたはウシヤグロブリン、ヒト、ウシまたはウサギ血清アルブミン、もしくはかかる蛋白のメチル化または他の誘導体のような哺乳類血清蛋白を含めた蛋白キャリアー

一分子が特に好適であるが、それらに限定されない。他の蛋白キャリアーは当分野で習熟した者にとって明白であろう。必ずそうというわけではないが蛋白キャリアーはアイメリア蛋白に対する抗体を惹起させる予定の宿主動物に異種のものであるのが好ましい。

【0058】キャリアー分子への共有結合は当分野でよく知られた方法を用いて実施でき、その厳密な選択は用いるキャリアー分子の性質に左右されよう。免疫原性キャリアー分子が蛋白である場合、本発明の蛋白または断片は、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドのような水溶性カルボジイミド類またはグルタルアルデヒドを用いて結合させることができる。

【0059】このようなカップリング剤はまた、別のキャリアー分子を使用せずに、蛋白および断片をそれら自体に架橋するためにも使用できる。蛋白または蛋白断片の集合体をもたらすこのような架橋も免疫原性を高めることができる。有効量の本発明ワクチンの投与によりE. テネラによる感染から家禽を保護することができる。E. テネラ抗原に対するモノクローナル抗体はインビトロでE. アセルブリナ（E. acervulina）およびE. マキシマ（E. maxima）と交差反応し、このことはこれらの種に対しても防御が賦与されうることを示している。本発明蛋白または蛋白断片の有効量は約5-50 μg/kg（ワクチン接種動物の体重）の範囲である。約25-50 μg/kgの量が好適である。最初のワクチン接種に続いて、1週間ないし数週間後に追加免疫接種が行われるのが好ましい。追加免疫は複数回投与できる。かかる追加免疫量は一般に約5-50 μg/kg、好ましくは約20-50 μg/kgである。投与経路は皮下、皮内、筋肉内、経口、肛門または卵内投与のような標準経路が使用できる。

【0060】また、家禽の免疫系への本発明コクシジウム抗原の投与は、その抗原をコードする遺伝子を細菌（例、E. コリ、サルモネラ）またはウイルス（例、ボックスウイルス、ヘルペスウイルス）にクローニングし、その生きたベクター系を、または適宜にその不活化形態を家禽に経口的に、注射により、あるいは他の常用される経路により投与することによっても達成できる。Carbitら Vaccines, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory, p.68-71 はE. コリの使用を記載し、一方Clements Pathol. Immunopathol. Res. 6:137 (1987)はサルモネラの使用を記載している。Mossら Ann. Rev. Immunol. 5:305 (1987)は組み換えボックスウイルスを使用するウイルスベクター系の使用を概説している。

【0061】ボックスウイルスの1種であるワクシニアウイルスは細胞培養物および動物へのコクシジウム抗原の付与を試験するために使用できる。分析試験には、ワクシニアウイルスは鶏痘ウイルス（使用できるもう一つのボックスウイルスキャリアー）よりも効果的であることが判明している。これはワクシニアウイルスがトリウ

イルスより速やかに増殖し、そしてニワトリ細胞に制限されない宿主領域を有するためである。大量の異種DNAを、ウイルスの成熟および感染力を妨げずにワクシニアウイルスゲノムに挿入することが可能である〔Smithら, *Gene* 25:21(1983)〕。ウイルスを用いた、多重異種遺伝子の挿入および発現は、感染動物に発現抗原に対する抗体の産生を誘起させる〔Perkusら, *Science* 229:981 (1985)〕。

【0062】組み換えワクシニアウイルスの作製に使用される技術は、ルーチン法によって鶏痘ウイルスやヘルペスウイルス系に容易に適合させることができる。本発明蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを含有する組み換えウイルスは、

(a) 前記蛋白をコードするヌクレオチド配列を有するDNAを、ウイルスの成熟および感染力を阻害することなくウイルスゲノムに挿入し；

(b) 該組み換えウイルスを細胞培養物内で増幅させ；そして

(c) 培地から組み換えウイルスを精製することにより作製できる。

【0063】コクシジウム症に対するワクチンにおいて組み換えウイルスをキャリアーとして使用することは、ワクチン接種した家禽がコクシジウム抗原とウイルスキャリアーの両方に対して免疫を獲得する（すなわち、このようなワクチンは二価である）という点で特に有利である。かかるワクチンの有用性はキャリアーウイルスに別の遺伝子を挿入することによってさらに増強できる。例えば、ニューカッスル病ウイルスゲノムの一部をコクシジウム抗原遺伝子と共に鶏痘ウイルスに挿入することができ、これにより単一のワクチンを用いてニューカッスル病、コクシジウム症および鶏痘の全てに対する免疫を賦与することができる。

【0064】本発明のベクター生ワクチンの投与は当分野でよく知られた多数の方法によって行いうる。例えば、鶏痘ウイルスに対して家禽を予防接種するのに普通に用いられる“スティック (stick)”法を使用することができる。この方法はワクチンに浸した鋭利な針で翼の飛膜 (wing web) の皮膚を突いたり刺したりすることから成っている。この針は通常ミシン針のように先端付近に1滴のワクチンを保持する穴がついている。あるいはまた、生ワクチンは翼の飛膜または任意の他の部位に皮下もしくは皮内注射することもできる。

【0065】さらに、組み換えベクター生ワクチンは飲み水に加えてもよく、それどころかワクチン接種しようとするニワトリにスプレーしてもよい。それらはまた、好ましくは保護カプセル封入後に〔Balancouら, *Nature* 322:373 (1986)〕餌の中に、あるいは卵の中に投与することもできる。後者の方法では、ウイルスワクチンがニワトリの胚に直接注入される〔Sharma, *Avian Dis.* 25:1155 (1985)〕。

【0066】

【実施例】ここに引用した文献はすべて参照としてその全てがここにとり込まれるものとする。特に指定しない限り、固体混合物中の固体、液体中の液体、および液体中の固体について以下に示す百分率はそれぞれ wt/wt、vol/vol および wt/vol 基準である。

メロゾイトの精製

E. テネラのメロゾイトは、鳥一羽あたり50,000個の上記胞子形成オーシストを感染させた5日後に、50羽の感染ニワトリ（生後3週間、Hubbard Cross; Avian Services, Frenchtown, NJ）の盲腸から収穫した。他の起源の同様のニワトリを使用してもよい。盲腸を取り出し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて磁気攪拌機上で15分間洗浄した。低速遠心 (50 x g) により上皮細胞破片を部分的に除き、そして粗製メロゾイトを2,000 x g, 4°Cで10分間遠心して回収した。ペレットを Lysing 緩衝液 (8.29 g/l NH₄Cl, 0.372 g/l Na₂EDTA, 1.0 g/l KHCO₃, pH 7.6) に懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。メロゾイトを遠心により集め、PBSで1回洗浄し、そして分液漏斗中にスパンナイロン繊維 (Scrub Nylon Fiber, Fenwall Laboratories, Deerfield, IL) 1.0 gを含有するカラムに通した。メロゾイトを前のように遠心により集め、そしてRNA単離のためにドライアイス上で凍結するか、あるいはウェスタンブロット分析のためにジエチルアミノエチルセルロース (DEAE, Whatman DE52, Whatman Bio Systems, Inc., Clifton, NJ) でさらに精製した。

【0067】DEAEセルロースでの精製には、約1 x 10⁹ 個のメロゾイトをPBS中で10 mlベッドボリュームのカラムにかけ、PBSで溶離した。メロゾイトは最初の100 mlの通り抜け画分中に回収され、実質的に赤血球および他の細胞破片を含んでいなかった。

¹²⁵I-標識表面蛋白の免疫沈降

精製したメロゾイトの表面蛋白を IODOGEN 法 (Pierce Chemical Co.) によるか、または IODOBEADS (Pierce Chemical Co.) の使用により¹²⁵Iで標識した。後者の方法では、4つの IODOBEADS を0.2 Mリン酸ナトリウム, pH 7.5で3回洗浄し、1-3 mCiの¹²⁵I-Naを加え、そして室温で5分間インキュベートした。この反応バイアルに200 μlのPBS, pH 7.0中の精製メロゾイト (3 x 10⁸) を加え、インキュベーションを15分間続けた。インキュベーションの終わりに、フェニルメタンスルホンフルオリド (PMSF) を最終濃度5 mMとなるまで加えた。

【0068】標識したメロゾイトを12,000 x gで30秒遠心することによりインキュベーション混合物から回収し、そしてPBS, pH 7.0中の2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) または1%トリトンX-100

21

0のいずれかの1ml中に可溶化した。不溶物質は12, 000xgで3分間遠心して除いた。可溶蛋白を3, 500分子量カットオフメンブランを用いて4°Cで3リットルのPBS, pH7.0で透析して、残留する遊離の¹²⁵Iを除去した。¹²⁵I-標識蛋白(一般に約1.5x10⁵cpmが蛋白に組み込まれる)を使用時まで4°Cで貯蔵した。TCA沈殿可能な放射能は一般に全放射能の95%を越えていた。

【0069】グルタルアルデヒド固定メロゾイトに対するウサギ抗血清は次のようにして調製した: 約1x10⁹個の精製メロゾイトをPBS中の1%グルタルアルデヒドに懸濁し、そして室温で5分間インキュベートした。固定された寄生虫は2000xgで5分間遠心することにより回収し、PBSで3回洗浄し、そして1mlのPBS中に再懸濁した。ニュージーランド白ウサギの背中皮膚に0.5mlの完全フロインドアジュバントで乳化した固定寄生虫溶液を数回皮内注射して合計0.5mlを投与した。これらのウサギに2週間の間隔をおいて不完全フロインドアジュバント中に同一の寄生虫蛋白を含む追加免疫注射を2回与えた。最後の追加免疫の2週間後に耳の静脈から採血し、凝固した血液サンプルを2500xgで15分間遠心することにより抗体含有血清を得た。

【0070】免疫沈降用の標識蛋白のサンプル(5μl, 5x10⁵cpm含有)を100μlのIP緩衝液(0.25%NP-40, 20mMトリス-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl)中に希釈し、5μgのStaph-A蛋白(Pansorbin(登録商標), Calbiochem Corp., San Diego, CA)と共に氷上で20分間インキュベートすることにより予め清澄化し、そして5-10μlのウサギ抗メロゾイト血清と4°Cで数時間インキュベートした。抗体複合体を5μgのStaph-A蛋白と氷上で20分間2回目のインキュベーションを行って集め、Eppendorf 遠心機で15秒間遠心した。このペレットをIP緩衝液で4回洗い、そして抗体試薬により免疫沈降し標識蛋白をSDSゲルサンプル緩衝液(65mMトリス, pH6.8, 0.5%SDS, 5%β-メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 0.1%ブロモフェノールブルー)中100°Cで5分間加熱することにより複合体から溶離した。SDS-PAGEは Laemmli Nature 227:680 (1970) に記載のようにして実施した。

【0071】ウサギ抗血清で得られた結果は以下のようになり調製した免疫ニワトリ血清を用いて確認された: ニワトリをE. テネラの生存胞子形成オーシストを繰り返し感染させることにより免疫した(100, 000オーシスト、2週間の間隔で3回与えた)。血液を心臓穿刺により採取し、抗体含有血清を2500xgで5分間遠心したのち凝固細胞破片から分離した。

【0072】抗メロゾイトウサギ血清および免疫ニワ

22

トリ血清を用いて(1)¹²⁵I-表面-標識アイメリアメロゾイト蛋白および、(2)ポリ(A)含有メロゾイトRNAのインビトロ翻訳産物を免疫沈降させる比較実験を行った。次に、沈殿した蛋白をSDS-PAGEにかけ、標準フルオログラフィー技法および試薬を用いるフルオログラフィーにより可視化した。

【0073】これらの実験により、両方の起源からの多数の蛋白が両方の血清によって沈降されることが判明した。従って、どちらの血清もアイメリア蛋白を発現する遺伝子組み換え体をスクリーニングするのに使用できよう。便宜上、以下で説明するスクリーニング法では最初にウサギ抗メロゾイト血清が使用された。しかしながら、以下に記載するcDNAライブラリーの平行スクリーニングでは免疫ニワトリ血清が使用された。これは、ニワトリ血清のみが生存生物でのチャレンジに应答して生産されたので、伝染性生物に対する免疫応答に重要な役割を果たすと思われる蛋白の同定に必要不可欠であった。免疫したニワトリだけが明らかにこのような生物に抵抗を示した。

【0074】アイメリア蛋白に対するウサギ抗メロゾイト血清の特異性を増強するために、Hallら、前出、により実質的に記載された抗体選別(antibody select)をこの血清に対して実施した。簡単に説明すると、組み換えファージクローン(以下参照)により発現された前駆体蛋白に特異な抗体が次のようにしてウサギ抗メロゾイト血清から精製された。

【0075】陽性ファージを高密度にまき、42°Cで3.5時間増殖させた。融合蛋白の発現はこのプレートに10mMイソプロピルチオガラクトシド(IPTG)を飽和させたニトロセルローズフィルターを重ねることにより誘導し、インキュベーションを37°Cで6-8時間続けた。抗原負荷フィルターをTBS(20mMトリスHCl, pH8.0, 150mM NaCl)で洗浄し、過剰の抗メロゾイト血清(E.コリ宿主細菌を用いて予め吸収させたもの)と4°Cで8-10時間インキュベートした。このフィルターをTBSで3回洗浄して非特異的抗体を除去した。

【0076】フィルター上で融合蛋白に特異的に結合した抗体を0.1Mグリシン, pH2.6, 0.15M NaClの2.0mlで溶離した(20°Cで15分)。溶離された抗体を直ちに同量の0.1MトリスHCl, pH8.0で中和した。選別した抗体(以後“抗体選別した抗体”と呼ぶ)を次に表面標識メロゾイトまたはインビトロ翻訳産物の免疫沈降に、あるいは全メロゾイト蛋白のウェスタンブロットにおけるプローブとして使用した。対照血清は抗体選別法において非組み換えファージを用いて調製した。

【0077】抗体選別した抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫沈降分析の結果は図2に示してある。標識蛋白の免疫沈降産物は Bonner ら Eur.J.Biochem., 4

6:83(1974)] に記載されるフルオログラフィーにより可視化した。図面の右側の数字はキロダルトンで示した大きさの分子量マーカー蛋白の位置を示す。図2のパネルAは対照(a)または抗体選別した抗体(b)を用いて検索した全メロソイト蛋白のイムノプロットである。パネルBは対照(a)または抗体選別した抗体(b)で免疫沈降し²²⁵ - I - 表面標識メロソイト蛋白を示す。

メロソイトmRNAの単離および インビトロ 翻訳

$1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ の生物を含有する凍結メロソイトペレットを1mMジチオトレイトール(DTT)および300単位のRNasin (Promega Biotec, Madison, WI) を含有する10mlのTEL/SDS緩衝液(0.2MトリスHCl, 0.1M LiCl, 25mM EDTA, 1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), pH8.8) 中で解凍し、そしてテフロン被覆組織ホモジナイザーを使って10-12ストロークでホモジナイズした。不溶性破片を3,000xgで低温で遠心して分離した。上清をTEL緩衝液で平衡化したフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(24:24:1, v/v)を用いて2回抽出した。

【0078】水相を100mg/mlのプロテイナーゼKを用いて37°Cで30分消化し、等容量のフェノール:クロロホルム(1:1)で再抽出しそして核酸を2倍容量のエタノールを用いてドライアイス上で1時間、または-20°Cで一晩沈殿させた。10,000xgで1時間遠心後、ペレットをTE(10mMトリス, pH7.5, 2mM EDTA)に再懸濁し、4mlのCsCl層(5.7M CsCl, 0.1M EDTA)を通して150,000xg, 15°Cで20時間遠心した。RNAペレットを2.5倍容量のエタノールを用いて0.2M酢酸カリウムから再沈殿させた。この全RNAを、Maniatis, 前出, p.197に記載されるようにして、オリゴ-dTセルロースに一回通してポリ(A)⁺ RNAを濃縮した。 5×10^9 メロソイトからの全RNA 1.9mgの一般的収量は約20μgのポリ(A)⁺ RNAを含んでいた。

【0079】0.1-0.5μgのmRNAを用い、反応混合物20μlあたり10-20μCiの³⁵S-メチオニンを補添したヌクレアーゼ処理ウサギ網状赤血球溶解物(Amersham Corp., Arlington Heights, ILまたはPromega Biotec) 中で インビトロ 蛋白合成を計画した。インビトロ翻訳産物は先に述べたように免疫沈降に続くSDS-PAGEにより分析し、フルオログラフィーにより可視化した。これらの結果は図2、パネルCに示してある。

【0080】パネルCのレーンaは、ポリ(A)含有メロソイトRNAにより計画された産物の完全な混合物を示す。レーンb、cおよびdは、それぞれラムダ5-7と命名された組み換えファージクローン(以下参照; このクローンはアイメリア前駆体蛋白をコードする遺伝子

を発現する)、抗メロソイト血清と反応する別のファージクローン、および非組み換えラムダgt11クローンにより選択された抗体により免疫沈降された翻訳産物を示す。

【0081】図2、パネルCのレーンaおよびcには、約30キロダルトンの見掛け分子量をもつ主要蛋白が見られることに注意すべきである。この蛋白は抗体選別した抗体により検索された全メロソイト蛋白を含有するレーン(パネルA、レーンb)には存在しないが、このゲルには23キロダルトンバンドが見られる(パネルA、レーンb、矢印)。この23キロダルトン蛋白はまた図2、パネルB、レーンbに示されるように²²⁵ - I - 標識メロソイト蛋白から抗体選別した抗体によっても免疫沈降された。これらの観察を合わせると、30キロダルトン前駆体蛋白が成熟メロソイト中で蛋白分解的切断により23キロダルトン表面抗原にプロセッシングされることを示唆している。

メロソイトcDNA発現ライブラリーの作製

二本鎖cDNAは6μgのメロソイトポリ(A)⁺ RNAから、Gublerら, Gene25:263(1983)に記載されるようにして、オリゴ(dT)プライマーから伸長させるための逆転写酵素(BRL, Gaithersburg, MD)並びに相補鎖を合成するためのRNase H(BRL)およびE. コリDNAポリメラーゼI(New England Biolabs, Beverly, MA)を用いて合成した。次に、二本鎖cDNAはT4 DNAポリメラーゼ(BRL)を用いて平滑末端となし、製造者のプロトコールに従ってEcoRIメチラーゼ(New England Biolabs)で処理した後EcoRIリンカー(GGAATTCC, Collaborative Research Inc., Bedford, MA)を付加した。

【0082】EcoRIで消化後、下記の Huynhらにより記載されるようにして、cDNAをバイオゲルA-50Mで分画化して過剰のリンカー分子と約300bpより小さいcDNAを除去した。次にこのcDNAをエタノール沈殿によって濃縮した。ライブラリーは D.Glover (編), DNA Cloning Vol. I: A Practical Approach, 1985, IRL Press, Washington, D.C., p.49-78 中で Huynhらにより記載されるようにしてλgt11(Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA)中に作製した。EcoRI cDNA断片を、EcoRI消化した脱リン酸化λgt11アーム(Stratagene Cloning Systems)に連結し、そして生成するDNAを製造者のプロトコールに従ってGigapack(登録商標)キット(Stratagene Cloning Systems)を使ってファージにパッケージングした。

【0083】生成したライブラリーをY1088宿主細胞にまいて増幅させた。組み換え体の百分率は、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG, Sigma Chemical Co.)の存在下X-galプレート(Maniatis, 前出, p.24)上で青色ブラック対無色ブラックの比から、約

90%であると概算された。

cDNAライブラリーの免疫学的スクリーニング

λgt11メロゾイトcDNA発現ライブラリーを、約10000ブランク/150mmプレートの密度でY1090細胞にまいた。かかるプレート6個を42°Cで3.5時間インキュベートし、10mM IPTGに予め浸したニトロセルロースフィルターを重ねてβ-ガラクトシダーゼ融合蛋白の発現を誘導し、そして37°Cでさらに4-5時間ないし一晩インキュベートした。フィルターをプレートからとり出し、TBS(20mM トリスHCl, pH8.0, 0.15M NaCl)で数回パッチ洗浄した。非特異的蛋白結合部位は20%ウシ胎児血清(FCS)を含有するTBS中で室温にて1時間インキュベートすることにより遮断した。

【0084】次にフィルターを、Y1090細胞を用いて予め吸着させたウサギ抗メロゾイト血清と共に、20%ウシ血清を含有するTBS中1:100の希釈度で1時間インキュベートした。非特異的抗体はTBSでの連続洗浄(このうちの1回は0.1%NP-40を含有)で除去した。この、フィルターをヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ接合体(BioRad, Richmond, CA)と共にウシ血清含有TBS中1:1000の希釈度で室温にて1時間インキュベートした。4-クロロ-1-ナフトール(BioRad)を用いて製造者の説明書に従い発色反応を起こさせた。

【0085】免疫ニワトリからの血清もスクリーニングに使用した。この血清はY1090細胞を用いて予め吸着させ、そしてウサギ血清と同じ希釈度で使用した。ウサギ抗ニワトリ抗体を第二抗体として使用し、ヤギ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体を検出抗体として使用した。単一ブランクが同一試薬を使って2回目のスクリーニングにより単離された。

【0086】ラムダ5-7と命名された1つのクローンは、ウサギ血清からの抗体と強く反応する蛋白を生産した。第二単離物であるI-5は免疫ニワトリ血清を用いたスクリーニングにより同定され、5-7クローンと同じ大きさのcDNA挿入物を含有することが証明された。DNA配列解析により、これらのファージクローンは同じメロゾイト抗原をコードすることが示された。

E. コリ内でのラムダ5-7 cDNAの発現

ラムダ5-7からの1.2kb挿入物をEcoRI消化およびアガロースゲル電気泳動により単離した(Maniatisら, 前出, p.157-170)。EcoRI末端をdATPおよびdTTPの存在下にクレノウポリメラーゼで修復し、そして両末端にBamHIリンカー(GGGATCC)を連結させた。この修飾断片を3種類の発現ベクターpDS56/RBSII, pDS56/RBSII, -1およびpDS56/RBSII, -2のそれぞれのBamHI部位に挿入した。これら3種類のベクターについては以下で説明する。起こりうる両方の方向で

挿入物を含有するプラスミドを、Mandelら J.Mol.Biol. 53:159 (1970)に記載されるようにして、適合性プラスミドpDMI.1を担持するE. コリM15株に形質転換した。プラスミドpDS56/RBSIIおよびpDMI.1を保有するE. コリM15株は欧州特許出願公開第316695号に開示されている。

プラスミドの構築

一般に、プラスミドpDS56/RBSII, -1および-2は調節可能なプロモーター/オペレーター要素N25OPSN25OP29およびリボソーム結合部位RBSII, RBSII(-1)およびRBSII(-2)をそれぞれ含有する。これらのリボソーム結合部位はE. コリファージT5のプロモーターP₂₅のリボソーム結合部位に由来し〔欧州特許出願公開第207459号〕、DNA合成により得られた。

【0087】高い発現効率ゆえ、前記プラスミドは、プロモーター/オペレーター要素がオペレーターへのlacリプレッサーの結合により抑制される場合にのみ、E. コリ細胞内に維持されうる。N25OPSN25OP29は、十分な数のリプレッサー分子が細胞内に存在する場合にのみ、効果的に抑制されうる。それ故に、リプレッサー遺伝子の発現増加をもたらすプロモーター変異型を含有するlacI^q対立遺伝子を使用した。このlacI^q対立遺伝子は以下で説明するプラスミドpDMI.1上に存在する。

【0088】pDMI.1プラスミドは、lacI遺伝子のほかに、細菌にカナマイシン耐性を付与し、選択マーカーとして使用されるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を担持する。pDMI.1はpDS56/RBSII, -1および-2プラスミドと適合しうる。発現ベクターpDS56/RBSII, -1および-2で形質転換されるE. コリ細胞は、この発現ベクターが細胞内に安定して保持されるよう確保するために、pDMI.1を含有する必要がある。この系の誘導は培地にIPTGを加えることにより達成される。

プラスミドpDS56/RBSII

XbaIとXhoIの制限切断部位間にありかつ複製領域およびβ-ラクタマーゼ遺伝子(細胞にアンピシリン耐性を与える)(図4および5参照)を含有するpDS56/RBSIIの部分は、もともとプラスミドpBR322から誘導された〔Bolivarら, Gene 2:95-113 (1977); Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90 (1979)〕。しかしながら、β-ラクタマーゼ遺伝子は制限酵素HincIIおよびPstIの切断部位を除くことにより修飾される。DNA配列におけるこれらの変更はβ-ラクタマーゼのアミノ酸配列に何ら影響を与えない。このプラスミドの残りの部分は調節可能なプロモーター/オペレーター要素N25OPSN25OP29、リボソーム結合部位RBSII(EcoRI/BamHI断片の部分である)、制限酵素Sal

I、Pst IおよびHind IIIの切断部位、E. コリファージラムダのターミネーター。〔Schwarz ら, Nature 272:410-414 (1978)〕、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのプロモーター不含遺伝子〔Marcoli ら, FEBS Letters, 110:11-14 (1980)〕およびE. コリ r r n B オペロンのターミネーター T1〔Br osius ら, J.Mol.Biol. 148:107-127 (1981)〕を担持する。

プラスミド pDS56/RBSII (-1)

プラスミド pDS56/RBSII (-1) (図6および7) はプラスミド pDS56/RBSII と同様であるが、リボソーム結合部位 RBSII (-1) を含有する。

プラスミド pDS56/RBSII (-2)

プラスミド pDS56/RBSII (-2) (図8および9) はプラスミド pDS56/RBSII と同様であるが、リボソーム結合部位 RBSII (-2) を含有するでいる。

【0089】これら3種類のプラスミドの差異は、それらが全3種の可能なリーディングフレームからの蛋白発 20 現をもたらすATG開始コドンに続く1つのヌクレオチドが相違する点である。

プラスミド pDMI. 1

プラスミド pDMI. 1 (図10および11) は、E. コリ細胞にカナマイシン耐性を付与するものであるトランスポゾン Tn5〔Beck ら, Gene 19:327-336 (1982)〕からのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、および lacリプレッサーをコードするものであるプロモーター変異 I^a〔Calos, Nature 274:762-765 (1978)〕を伴う lacI 遺伝子〔Farabough, Nature 274:76 5-769 (1978)〕を担持する。さらに、プラスミド pDMI. 1 は複製および娘細胞への安定した伝達に必要な全ての情報を含有するプラスミド pACYC184〔Chan 30 q および Cohen, J.Bacteriol. 134:1141-1156 (1978)〕の領域を含有する。

【0090】上記のプラスミドに加え、E. コリ発現系はどれもこの実験に有用であることが期待されることを理解すべきである。細菌形質転換体をLB培地中で37 °Cにて増殖させ〔Maniatis ら, 前出, p.68〕、この培地に1mM IPTGを加えることにより蛋白の発現 40 を誘導した。1時間のインキュベーション後、1mlのサンプルを採取し、サンプル中の細胞を遠心により集めた。細胞ペレットをCrowl ら, 前出, に記載されるようにして処理しそして溶解物をSDS-PAGEにかけた。電気泳動後、ゲル中の蛋白はクーマシーブリアントブルーで染色するか、あるいは前記のようにしてウサギ抗メロゾイト血清を用いるウェスタンブロット分析

〔Towbin ら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:4350 (1979); Burnett, Anal.Biochem. 112:195 (1981)〕のためにニトロセルロース膜に移行させた。

【0091】この分析では、3つの全てのリーディングフレームにおいて1つの方向にある1.2kbのcDNA分子が約30キロダルトンの見掛け分子量でもって移動しかつウサギ抗メロゾイト血清からの抗体と反応する蛋白を生産したことが示された。これは図1に示されるようにcDNA配列中のヌクレオチド68のATG開始コドンに先行する3つの全てのリーディングフレーム内の停止コドンの存在と一致する。

DNA配列解析

一般に、1mlの飽和一晚培養物からのプラスミドDNAの小規模分離は、Birnboim ら Nucleic Acids Research 7:1513 (1979)の方法を用いて実施した。この方法は分析目的のために細菌コロニーから少量のDNAを単離できる。比較的大量のプラスミドDNAは塩化セシウム遠心を用いる標準プロトコル〔Maniatis ら, 前出, p.93〕に従って1リットル培養物から調製した。

【0092】ラムダ5-7からの1.2kb EcoRI cDNA挿入物のDNA配列は次のようにして決定した。この挿入物をEcoRIで消化し、ゲル分離にかけ、Crowl ら, Gene 38:31 (1985)に記載されるEcoRI消化pEV-vrfプラスミドに連結した。このプラスミドをpEV/5-7と命名し、ハイブリダイゼーション分析(以下で説明する)用の1.2kb cDNA挿入物を増やすために、およびZagursky ら Gene Anal.Tech 2:89 (1983)の方法による予備DNA配列分析において使用した。

【0093】完全なDNA配列を決定するには、1.2kbのcDNA挿入物をM13、Mp18およびMp19一本鎖ファージベクターにBio-Rad M13クローニング・アンド・シーケンシングキットを用いてサブクローニングした。DNA配列はSanger ら Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463 (1977)のジデオキシ・チェーン・ターミネーション法を用いて、Bio-Radキットにより提供される試薬およびプロトコルを使って決定した。

【0094】5' および3' 非翻訳領域を含むラムダ5-7からの1.2kb cDNAの完全なヌクレオチド配列は図1に示してある。1-5と命名された、免疫ニワトリ血清を用いて上記のようにして調製した第二単離物のDNA配列を分析すると、この単離物が5' 末端で下記ヌクレオチドを付加的に含有しそして、5-7挿入物のEcoRI部位を欠くことが示された：

【0095】

【化4】

AATTGCGCTTTTCGCTTGCACCTTTGAGCTTCTTCTCGCTGGAGACCTTGTGTCTGAAC .. (I-5)

AATTCGG .. (5-7)

【0096】この第二単離物の配列の残りは塩基番号8からポリA鎖の始めまでのラムダ5-7の配列と同一であるが、ただしヌクレオチド番号300ではチミジン残基の代わりにシチジン残基が存在する。このcDNA配列は図1に示される200個のアミノ酸残基をコードする68位のATGから668位のTAA停止コドンまで延びるオープン・リーディング・フレームを予測させる。

【0097】200個のアミノ酸から成る蛋白についての24キロダルトンの理論的大きさは、抗体選別した試薬による免疫沈降(図3、パネルc、レーンb)において観察されたメロゾイトmRNAの一次翻訳産物、および前記E. コリ発現ベクター中のcDNAから発現された蛋白、の概算分子量よりもわずかに小さい。しかしながら、この理論的分子量は理論的分子量とSDS-PAGEでの分子量標準物に対する内挿により測定された分子量との間に予期される変動の範囲内である。

【0098】ラムダ5-7 cDNA挿入物によりコードされる蛋白の推定アミノ酸配列(図1)の分析により、最初の20個のアミノ末端アミノ酸残基はシグナル配列の存在を示唆する全体的疎水性をもつことが判明した。

ハイブリダイゼーション分析

DNAを以下のようにしてトリプシンおよび胆汁で処理し、PBSで洗浄した後の脱のうした胞子形成オーシストから単離した。

【0099】寄生虫物質(約 1×10^9 オーシスト)を20mlの0.5M EDTA, pH8.0, 0.5%サルコシル(Sigma, St. Louis, MO)に懸濁し、0.1 μ g/mlのプロテイナーゼK(Boehringer-Mannheim, BRD)を用いて50°Cで2時間、10 μ g/mlのRNアーゼを用いて37°Cで1時間、そして再度プロテイナーゼKを用いて50°Cで1時間消化した。蛋白は20 mMトリスHCl, pH7.5, 1mM EDTA (TE)を飽和させたフェノールで2回抽出しそしてフェノール/クロロホルム(1:1)で1回抽出することにより除いた。水相をTEに対して十分に透析し、エタノール沈殿により濃縮した。1 $\times 10^6$ オーシストあたりDNA 0.4 mgの一般的収量が得られた。

【0100】寄生虫DNAを製造者のプロトコールに従って種々の制限エンドヌクレアーゼで消化し、そして生成するDNA断片をLoening緩衝液(4.7g NaH₂PO₄, 4.36g トリス塩基, 0.372g Na₂EDTA/リットル, pH7.6)中の0.8%アガロース中40V, 2.5時間電気泳動することにより分離した。このゲルを0.25M HClで30分間処理し、そして0.4M NaOH中でZeta-Probeメンブラン

(Bio-Rad)に一晩移行させた。フィルターを2xSSC(pH6.8)で中和し、真空下に80°Cで1時間焼いた。

【0101】このフィルターを7%SDS, 1%BSA(Boehringer, フラクシオンV), 0.5M NaHPO₄緩衝液, pH7.2中65°Cで、3時間プレハイブリダイゼーションを行った。5-7遺伝子EcoRI挿入物は前記のpEV/5-7プラスミドをEcoRIで消化した後にゲル分離し、そして³²P-標識デオキシヌクレオチドの存在下にクレノウ断片でランダム・ライミングすることにより標識した。標識した挿入物をスピンカラム(Bio-Rad)中で組み込まれなかったヌクレオチドから分離し、変性させそしてハイブリダイゼーション溶液に加えた。65°Cで12時間インキュベーション後、フィルターを2xSSC/0.1%SDSで3回、そして0.1xSSC/0.1%SDSで2回、65°Cにて洗浄した。プローブとハイブリダイズするゲノムDNA断片をオートラジオグラフィーにより検出した。ここではpEV/5-7プラスミドが使用されたが、メロゾイト5-7遺伝子の1.2kbのcDNA挿入物を含有する任意の同等のベクターも許容できるやり方でその機能を果たすことが理解される。

【0102】この分析の結果は図3に示してあり、そこではPvuII(1)、HincII(2)、PstI(3)、SphI(4)またはSacI(5)による消化の結果が示される。6.5および3.6kbのゲノムDNA断片は、それぞれレーン1と5に、PvuIIおよびSacIでの消化後に検出された。cDNAクローンにはこれらの酵素の部位は存在しないので、アイメリア遺伝子の大きさは最大3.6kbであると見積もることができる。ゲノムDNAをEcoRIでの消化すると大きさの点でcDNA断片に一致する1.2kbゲノム断片が生成した。HincIIとEcoRIによる二重消化により、EcoRI部位により近接してはさまれたcDNA配列から予測される0.9kb断片が生成した。

【0103】PstI消化では3つの断片が検出された(レーン3)。cDNA配列から2つのPstI部位が予測され、これは305bpの内部断片および2つの接合断片をもたらすであろう。第三の大きいPstI断片の出現は恐らく内部PstI部位での不完全消化の結果である。cDNAを2回切断するSphIにより生成される断片のパターン(レーン4)からは何ら明確な情報を生いない。cDNA配列から予測される小さい内部SphI断片はこのゲルにおいては検出できなかった。

【0104】メロゾイトから単離されたポリ(A)含有

mRNAのノーザンブロット分析〔Alwineら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350 (1977)〕においては、ラムダ5-7遺伝子の1.2 kb cDNA断片は長さ約1.3 kbの単一のmRNA種にハイブリダイズした。大きさの相互関係から、5-7クローンは、前記1-5単離物から判明した5'伸長部と一緒に、5'末端ヌクレオチドの場合により除く、全長cDNA配列を表すことが明らかである。

【0105】諸般を考え合わせると、前記の観察はcDNAおよびゲノム配列の共直線性と一致する。当分野で習熟した者には明らかであるように、本発明の精神および範囲を逸脱することなく本発明の多くの修飾および変更が可能である。ここに記載した特定の実施態様は単なる例示であって、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】ウサギ由来の抗体選別した抗体と免疫ニワトリ血清により認識されるアイメリア前駆体蛋白をコードする1.2 kbのcDNA分子のヌクレオチド配列および該ヌクレオチド配列から推定されるアイメリア前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

【図2】種々のアイメリアメロゾイト蛋白のSDS-P*

*AGE分析の結果を示す。

【図3】PvuII (レーン1)、HincII (レーン2)、PstI (レーン3)、SphI (レーン4) またはSacI (レーン5)を用いて消化したアイメリア・テネラの胞子形成オーシストのゲノムDNAのサザンブロット分析の結果を示す。

【図4】プラスミドpDS56/RBSIIの模式図を示す。

【図5】プラスミドpDS56/RBSIIの全ヌクレオチド配列を示す。

【図6】プラスミドpDS56/RBSII(-1)の模式図を示す。

【図7】プラスミドpDS56/RBSII(-1)の全ヌクレオチド配列を示す。

【図8】プラスミドpDS56/RBSII(-2)の模式図を示す。

【図9】プラスミドpDS56/RBSII(-2)の全ヌクレオチド配列を示す。

【図10】プラスミドpDMI.1の模式図を示す。

【図11】プラスミドpDMI.1の全ヌクレオチド配列を示す。

【図2】

図 1b

```

781 CAGACGAAGACGGATACGTCGTCGAAGTCTTATGAAAACCGGACCCCATGGAGGAGTCG
841 ACATGATGACTAGCACAGCATCACAAAGGAAAATTCTGCGGAGTGCTTATGGATGACGGAA
901 AAGGAAACCTAGTCGATGGACAAGGGAGAAAAATTACCGCCGTTATCGCATGCTAACTCA
961 ACCGGATACCGAGTTTAGAAGCGGACCAGGAGACGACGAGGACGACGAGTGAGTGAGCGG
1021 AGTTGGCTTTTGTCCCTGTTGATGCCGTTGCCCACTTTTCGCAGCTTGCTTGTTCCTGGG
1081 CTTGCCTGTGCCGCGACATGCGCTTGGCGTTCCGCCTGAGTTCTTTCGGACTGTTTAAAC
1141 TTTTAATTTCATTTTCTACTGCGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1194

```

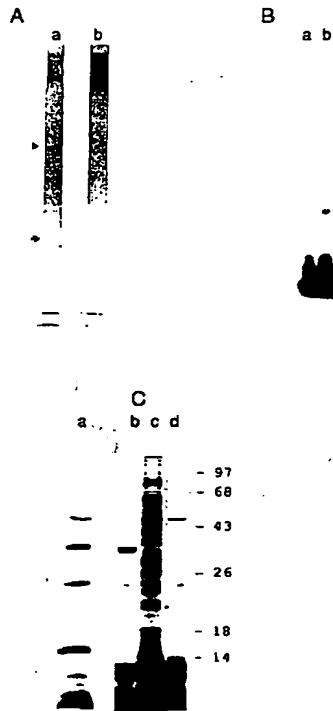
【図1】

図1a

1 GCTTTTGCCTCGGAGATAGTCGTTGTGTGTTTGC GCGATCACCCGGAACCTCTCTACCA
61 ACTGAAAATGGCTAAGTCTATGCTTTCTGGAATTGTTTTGCTGGTCTTGTGCTGCTGC
M A K S M L S G I V F A G L V A A A
121 AGCGGCCAGTTCCGCCAACAGCGCCGCCAACGTCTCCGTTTGGAGAGTGGGCCCCGTGT
A A S S A N S A A N V S V L E S G P A V
181 GCAGGAAGTGCCAGCGGCACGGTCACAGCTCGCCTGGCGAAGCCTTGTCTGCTTCTTTC
Q E V P A R T V T A R L A K P L L L L S
241 TGCTCTTGCTGCGACTTTGGCAGCAGCTTTCCTCGTTTTGCAATGCTTCAACACCATCTC
A L A A T L A A A F L V L Q C F N T I S
301 CAGCAACAACCAGCAAACCAGCGTCAGGAGACTGGCCGCCGAGGTGCATGCGGAGATGA
S N N Q Q T S V R R L A A G G A C G D E
361 GGAAGATGCAGATGAGGGAACCTCACAGCAGGCCAGCCGAGGAGGAGAAAACCTGATAC
E D A D E G T S Q Q A S R R R R K P D T
421 CCCTGCAGCAGATAAATACGATTTTGTGGCGGAACCTCEAGTTTCGGTCACTGAGCCGAA
P A A D K Y D F V G G T P V S V T E P N
481 TGTTGATGAAGTCCTTATCCAAATTAGAAATAAACAATCTTTTGAAGAACCCATGGAC
V D E V L I Q I R N K Q I F L K N P W T
541 TGGACAAGAAGAACAAGTTCTAGTACTGGAACGACAAAGTGAAGAACCCATTCTGATTGT
G Q E E Q V L V L E R Q S E E P I L I V
601 GGCGAGGACAAGACAACACTTGAAGGATATCTTGGTAGTCAGCTCTTGACAGGACGGAA
A R T R Q H L K D I L V V S S C T G R K
661 AGACTGCTAAAGAAGAGAAAGTTGAAGGAGGCAAACTCACAGAAGATATAAAGTCAAGA
D C
721 GCAGCGACCCAGGATATGGATTCCCATACACCACGGTGCCTCGACGGGGTTCTGTGGGAA

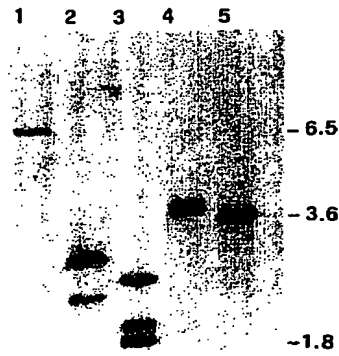
【図3】

図 2



【図4】

図 3

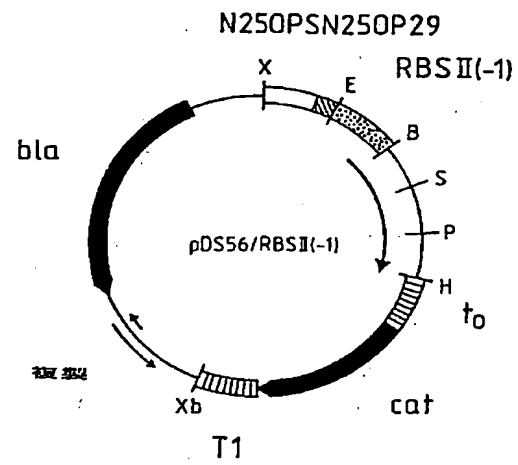
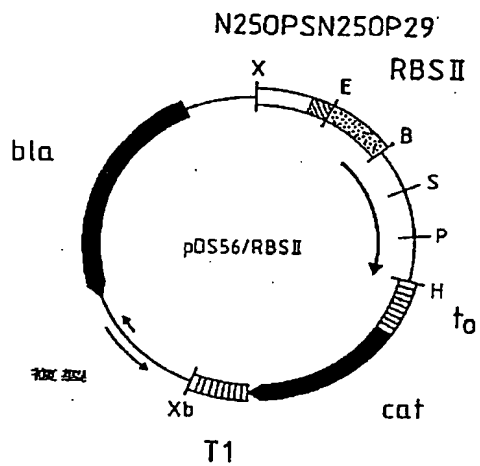


【図9】

図 6

【図5】

図 4



【図6】

図 5 a

XhoI
1 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTGCIT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI
51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCAATTAAAG

BamHI Sali PstI HindIII
101 AGGAGAAATT AACTATGAGA GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTTAATT
MetArg GlySerValA spLeuGlnPr oSerLeuIle

151 AGCTGAGCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAACTCC
Ser

201 ATCTGGATTT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT TTTTATTGGT

251 GAGAATCCAA GCTAGCTGGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA

301 TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT

351 CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA

401 CCAGACCGTT CAGCTGGATA TTACGGCCTT TTTAAGACC GTAAAGAAAA

451 ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCCTTTATTC ACATTCCTGC CCGCCTGATG

501 AATGCTCATC CGGAATTTGG TATGGCAATG AAAGAAGGIG AGCTGGTGAT

551 ATGGGATAGT GTTCAACCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA

601 CGTTTTCATC GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTTCGG GCAGTTTCTA

651 CACATATATT CGCAAGATGT GCGGTGTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT

701 CCCTAAAGGG TTTTATGAGA ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCTGGG

751 TGAGTTTCAC CAGTTTGTAT TTAAACGTGG CCAATATGGA CAACTTCTTC

801 GCGCCGGTTT TCACCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT

851 GATGCCGCTG GCGATTCAGG TTCACTATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG

901 TCGGCAGAAAT GCTTAATGAA TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC

951 GGGCGGTAAT TTTTTAAGG CAGTTATTGG TGCCCTTAAA CGCCTGGGGT

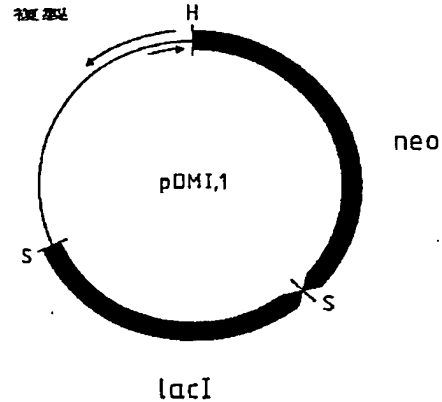
1001 AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAATAA AACGAAAGGC TCAGTCGAAA

1051 GACTGGGCTT TTCGTTTAT CTGTGTTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG

XbaI
1101 TAGGACAAAT CCGCCGCTCT AGAGCTGCCT CGCGGTTTC GGTGATGACG

【図17】

図 10



【図7】

5 b

1151 GTGAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGCTCG
1201 TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCGCGT CAGCGGGTGT
1251 TGGCGGGTGT CCGGGCGCAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG
1301 TGTATACTGG CTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC
1351 ACCATATGCG GTGTGAAATA CGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
1401 ATCAGGCGCT CTTCGGCTTC CTGCTCACT GACTCGGTGC GCTCGGTCTG
1451 TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTAT
1501 CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG
1551 CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCGCGT TTCTGCGGT TTTTCCATAG
1601 GCTCCGCCCC CTTGAGGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT
1651 GCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
1701 TCCCTGCTGC GCTCTCGTGT TCGACCGCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC
1751 CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGGCTT TTCTCAATGC TCACCGTGTA
1801 GGTATCTCAG TTGGTGTAG GTGTTGCTT CTAAGCTGGG CTGTGTGCAC
1851 GAACCCCCCG TTGAGGCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT
1901 TGAGTCCAAC CCGTAAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGGCACTG
1951 GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
2001 AAGTGGTGGC CTAACTAAGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG
2051 CGCTCTGCTG AAGCCAGTGA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT
2101 CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG
2151 CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC
2201 TACGGGTCTT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTGG
2251 TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTA AAAA
2301 TGAAGTTTGA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG
2351 TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT
2401 GTTCATCCAT AGCTGCCTGA CTCCCGGTG TGTAGATAAC TACGATACCG
2451 GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTCTGCA ATGATACCGC GAGACCCAG

【図8】

5 c

2501 CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG
 2551 AGGCGAGAAG TGGTCCTGCA ACTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
 2601 TGTTCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTCGGCAA
 2651 CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCAGGCTCG TCGTTTGGTA
 2701 TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC
 2751 CCCATGTTGT GCAAAAAGC GGTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT
 2801 CAGAAGTAAG TTGGCCGCG TGTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC
 2851 ATAATCTCT TACTGTCAIG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
 2901 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG
 2951 CTCTTGCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CCGGCCACAT AGCAGAACTT
 3001 TAAAAGTCT CATCATGGA AAAGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG
 3051 ATCTTACCG TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA
 3101 CTGATCTTCA GCATCTTTA CTTTACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA
 3151 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGCGGAC ACCGAAATGT
 3201 TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTATCAGGG
 3251 TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTGA ATGTATTAG AAAAATAAAC
 3301 AAATAGGGT TCCGCGCACA TTTCCCGAA AAGTGCCACC TGAGGTCTAA
 3351 GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG
 3401 GCCCTTTCGT CTTCAC

【図10】

図 7 a

```

XhoI
1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

EcoRI
51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

BamHI SalI PstI HindIII
101 AGGAGAAATT AACTATGAGG GATCGTCTGA CCTGCAGCCA AGCTTAATTA
MetArg AspProSerT hrCysSerG1 nala

151 GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
201 TCTGGATTG TTCAGAACGC TCGGTGCGG CCGGGCGITT TTTATGGTG
251 AGAATCCAAG CTAGCTGGC GAGATTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT
301 GGAGAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC
351 GTAAAGAACA TTTTGAGGCA TTTCACTCAG TTGCTCAATG TACCTATAAC
401 CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAGACCG TAAAGAAAAA
451 TAAGACAAG TTTTATCCGG CCTTATTCA CATCTTGCC CGCCTGATGA
501 ATGCTCATCC GGAATTCGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA
551 TGGGATAGTG TTCACCTTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAACGAAAC
601 GTTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCAAGA CGATTCCGG CAGTTTCTAC
651 ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG GTGAAAACCT GGCCTATTTT
701 CCTAAAGGCT TTATGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT
751 GAGTTTCACC AGTTTGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
801 CCCCCTTTT CACCATGGGC AAATATTATA CGCAAGGCGA CAAGGTGCTG
851 ATGCCGCTGG CGATTCAGGT TCATCATGCC GTCTGTGATG GCTTCCATGT
901 CGGCAGAATG CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG
951 GGGCGTAATT TTTTAAAGC AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGGTA
1001 ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAATAAA ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG
1051 ACTGGGCCTT TCGTTTATC TGTGTTTGT CGGTGAACGC TCTCCTGAGT

XbaI
1101 AGGACAAATC CGCCGCTCTA GAGCTGCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG

```

【図11】

図 7b

1151 TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT
 1201 AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGT
 1251 GGGGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT
 1301 GTATACTGGC TTAACATATG GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA
 1351 CCATATGCGG TGTGAAATAC CGCACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA
 1401 TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT
 1451 CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTATC
 1501 CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC
 1551 AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG
 1601 CTCGCGCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG
 1651 GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT
 1701 CCTCGTGCG CTCCTCTGTT CCGACCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 1751 GCCTTTCTCC CTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGAG
 1801 GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCAGC
 1851 AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCGGTAA CTATCGTCTT
 1901 GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG
 1951 TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTCTTGA
 2001 AGTGGTGGCC TAACTACGGC TAACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 2051 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTGGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC
 2101 CGGCAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTITTTGTT TGCAAGCAGC
 2151 AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT
 2201 ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTAAAG GGATTTTGGT
 2251 CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT
 2301 GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAACTTG GTCTGACAGT
 2351 TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTG
 2401 TTCATCCATA GCTGCCTGAC TCCCGTCTGT GTAGATAACT ACGATACGGG
 2451 AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG AGACCCACGC

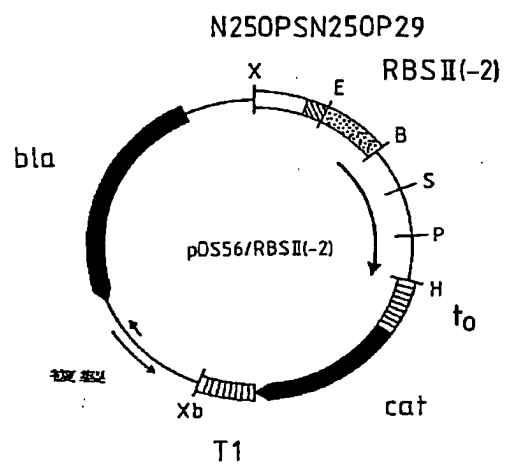
【図12】

図 7 c

2501 TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA
2551 GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAAAT
2601 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCCAAC
2651 GTTGTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT
2701 GGCTTCATTG AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC
2751 CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC
2801 AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG CAGCACTGCA
2851 TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG
2901 AGTACTCAAC CAAGTCATTG TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC
2951 TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT
3001 AAAAGTGCTC ATCATTGGA AAGCTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA
3051 TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC
3101 TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAC
3151 AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT
3201 GAATACTCAT ACTCTTCTT TTTCATTAAT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
3251 TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTGAA TGTATTTAGA AAAATAACA
3301 AATAGGGGTT CCGCGACAT TTCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG
3351 AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCAAGAGG
3401 CCTTTCGTC TTCAC

【図13】

図 8



【図14】

図 9 a

XhoI
 1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTCCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT
 EcoRI
 51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
 BamHI Sali PstI HindIII
 101 AGGAGAAATT AACTATGAGG ATCCGTCGAC CTGCAGCCAA GCTTAATTAG
 MetArg IleArgArgP roAlaAlaLy sLeuAsn
 151 CTGAGCTTGG ACTCCTGTTG ATAGATCCAG TAATGACCTC AGAACTCCAT
 201 CTGGATTGTG TCAGAACGCT CGGTTGCCGC CGGGCGTTTT TTATTGGTGA
 251 GAATCCAAGC TAGCTTGGCG AGATTTTCAG GAGCTAAGGA AGCTAAAATG
 301 GAGAAAAAAA TCACTGGATA TACCACCGTT GATATATCCC AATGGCATCG
 351 TAAAGAACAT TTTGAGGCAT TTCAGTCAGT TGCTCAATGT ACCTATAACC
 401 AGACCGITCA GCTGGATATT ACGGCTTTT TAAAGACCGT AAAGAAAAAT
 451 AAGCACAAGT TTTATCGGGC CTTTATTCAC ATTCTTGGCC GCCTGATGAA
 501 TGCTCATCCG GAATTTGGTA TGGCAATGAA AGACGGTGAG CTGGTGATAT
 551 GGGATAGTGT TCACCTTGTG TACACCGTTT TOCATGAGCA AACTGAAACC
 601 TTTTCATCGC TCTGGAGTGA ATACCACGAC GATTTCCGGC AGTTTCTACA
 651 CATATATTCG CAAGATGTGG CGTGTIACGG TGAAGACCTG GCTTATTTCC
 701 CTAAAGGGTT TATTGAGAAT ATGTTTTTCG TCTCAGCCAA TCCCTGGGTG
 751 AGTTTCACCA GTTTTGATTT AAACGTGGCC AATATGGACA ACTTCTTCGC
 801 CCCCGTTTTT ACCATGGGCA AATATTATAC GCAAGGCGAC AAGGTGCTGA
 851 TGCCGCTGGC GATTCAGGTT CATCATGCCG TCTGTGATGG CTTCCATGTC
 901 GGCAGAATGC TTAATGAATT ACAACAGTAC TGCGATGAGT GGCAGGGCGG
 951 GGGCTAATTT TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG CCTGGGGTAA
 1001 TGACTCTCTA GCTTGAGGCA TCAAAATAAA CGAAAGGCTC AGTOGAAAGA
 1051 CTGGGCCTTT CGTTTATCT GTTGTITGTC GGTGAACGCT CTCCTGAGTA
 XbaI
 1101 GGACAAATCC GCCGCTCTAG AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT

【図15】

図 9 b

1151 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTGTCTGTGA
 1201 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG
 1251 GGGGTGTTC GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG
 1301 TATACTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC
 1351 CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT
 1401 CAGGCGCTCT TCGCTTCTCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTGTC
 1451 GGTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC
 1501 ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA
 1551 AAAGGCCAGG AACCGTAAA AGGCGCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC
 1601 TCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG
 1651 CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC
 1701 CCTGTGCGC TCTCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
 1751 CCTTCTCCC TTGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG
 1801 TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA
 1851 ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG
 1901 AGTCCAACCC GGTAAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT
 1951 AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA
 2001 GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
 2051 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTGGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC
 2101 GGCAACAAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTGTGTTT GCAAGCAGCA
 2151 GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA
 2201 CGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT CAGGTAAGG GATTTTGGTC
 2251 ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG
 2301 AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT
 2351 ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTGCT
 2401 TCATCCATAG CTGCTGACT CCGCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA
 2451 GGGCTTACCA TCTGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGGA GACCCACGCT

【図16】

図 9 c

2501 CACCGGCTCC AGATTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCCG AAGGGCCGAG
2551 CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
2601 TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCCGAACG
2651 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG
2701 GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC
2751 CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCCG ATCGTTGTCA
2801 GAAGTAAGTT GCGCGCAGTG TTATCACTCA TGGTATGGC AGCACTGCAT
2851 AATTCTCTTA CTGTATGCC ATCCGTAAAG TGCTTTCTG TCACTGGTGA
2901 GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATCGGGCGA CCGAGTTGCT
2951 CTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA
3001 AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTCTCTCG GGGGAAAAC TCTCAAGGAT
3051 CTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT
3101 GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA
3151 GGAAGGCAAA ATGCCGCAA AAAGGGAATA AGGCGACAC GGAAATGTTG
3201 AATACTCATA CTCTCCITT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
3251 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA
3301 ATAGGGGTTG CGGCGACATT TCCCGAAAA GTCCACCTG ACGTCTAAGA
3351 AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGGAGGC
3401 CCTTTCGTCT TCAC

【図18】

☒ 11 a

HindIII

1 AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAAGGAAG

51 CGGAACAAGT AGAAGCCAG TCCGAGAAA CGGTGCTGAC CCGGATGAA

101 TGTACGCTAC TGGCTATCTT GGACAAGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA

151 AGCAGGTAGC TTGAGTGGG CTTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT

201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA

251 GGTGGGAAG CCTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA

301 TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGAGGATCG

351 TTTCGCATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG
Met

401 GGTGGAGAGG CTATTCGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT

451 CTGATGCCGC CGTGTTCGGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCCTTTT

501 GTCAAGACCG ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC

551 GGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGGGT TCTTTGCCA GCTGTGCTCG

601 ACGTTGTAC TGAAGCGGA AGGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTGCCG

651 GGGCAGGATC TCTGTCAAT TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT

701 CATGGCTGAT GCAATGCCGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC

751 CATTGACCA CCAAGCGAAA CATGCCATCG AGGAGGCAGG TACTGGATG

801 GAAGCCGGTC TTGTGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT

851 CGCGCCAGCC GAACTGTTTG CCAGGCTCAA GCGCGCATG CCGACGGCG

901 AGGATCTCGT CGTGACCAT GCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG

951 GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTCAATGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC

1001 GGACCCCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC

1051 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT

1101 CCGATTTCG AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCTTCTG
Phe

1151 AGCGGGACTC TGGGGTTGGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC

【図19】

11 b

1201 ATCAGGAGAT TTCGATTCCA CCGCGCCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
 1251 GAATCGTTTT CCGGACGCC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CCGGGATCTC
 1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCCA CCGCGGCTC GATCCCTCG CGAGTTGGTT
 1351 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACCACCTCGC GGAGTTCTAC CCGCAGTGCA
 1401 AATCCGTCCG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCCGG CATCCATGCC
 1451 CCGAACTGC AGGAGTGGGG AGGCAAGATG GCGCTTTTGG TCGACAATTC
 1501 GCGCTAACTT ACATTAATTG CGTCCGCTC ACTGCCCCGT TTCCAGTCCG
 (Gln)
 1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAAATGA TCGGCCAAGC CGCGGGGAGA
 1601 GCGCGTTTGC GTATTGGGGG CCAGGGTGGT TTTCTTTTTC ACCAGTGAGA
 1651 CCGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCTT GCGCCTGAGA GAGTTGCAGC
 1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCCAGCAGG CGAAATCTCT GTTGATGGT
 1751 GGTAAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTGGTATCG TCGTATCCCA
 1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACCCGCAGCC CCGACTCGGT AATGGCGCGC
 1851 ATTGGCCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
 1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGTTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
 1951 TCCAGTCCGC TTCCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTGATT GCGAGTGAGA
 2001 TATTATGCC AGCCAGCCG AGCAGACGC GCGAGACAG AACTTAATGG
 2051 GCGCGTAAC AGCGGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
 2101 CGCCAGTGG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
 2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
 2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTATCCAG CGATAGTTA ATGATCAGCC
 2251 CACTGACCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCGCTTT ACAGGCTTCG
 2301 ACGCGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
 2351 GCGCGAGAT TTAATCGCG CGACAATTG CGACGGCGCG TCGAGGGCCA
 2401 GACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT

【図20】

図 11 c

2451 TGTGCCACGC GGTGGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
 2501 TTTTTCCTGC GTTTCGCAG AAACGTGGCT GGCTTGGTTC ACCACGGGG
 2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGGGACATC GTATAACGTT
 2601 ACTGGTTTCA CATTACCCAC CCTGAATTGA CTCTCTCCG GCGCTATCA
 (Me t)
 2651 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TGCACCATTC GATGGTGTCA ACGTAAATGC
 Sali
 2701 ATGCCGCTTC GCCTTCGCGC GCGAATTGTC GACCTGTCC CTCTGTTC
 2751 GCTACTGACG GGGTGGTGGC TAACGGCAAA AGCACGGCCG GACATCAGCG
 2801 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTAATATGTT GGCCTGATG AGGGTGTGAG
 2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAG GCTGCACCGG TGGTTCAGCA
 2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTGGCTCACT GACTCGCTAC
 2951 GCTCGGTGCT TCGACTGCGG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACGGGGCGGA
 3001 GATTTCCTGG AAGATGCCAG GAAGATACCT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC
 3051 GCGGCAAGC CGTTTTCCTA TAGGCTCCGC CCGCTGACA AGCATCAAGA
 3101 AATCTGACG TCAAAATCAGT GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
 3151 ACCAGGCGTT TCCCTTGGCG GCTCCCTCGT GCGCTCTCTT GTTCTGCTT
 3201 TTGGGTTTAC CCGTGTCAAT CCGCTGTAT GCGCGGTTT GTCTCATTC
 3251 ACGCCTGACA CTCAGTTCCG GTTAGGCAGT TCGCTCCAAG CTGGACTGTA
 3301 TGCACGAACC CCGCTTCAG TCCGACCGCT GCGCTTATC CGGTAACAT
 3351 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC
 3401 CACTGGTAAT TGATTAGAG GAGTTAGTCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA
 3451 GGCTAAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TGGCTCTCTC CAAGCCAGTT
 3501 ACCTCGGTTT AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCCT
 3551 GCAAGGCGGT TTTTGTGTTT TCAGAGCAAG AGATTACGGC CAGACCAAAA
 3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG AAAAAATATT TCTAGATTT
 3651 AGTGCAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAGC CCCATACGAT
 3701 ATAAGTTGTT AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

【手続補正書】

【提出日】平成5年10月20日

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

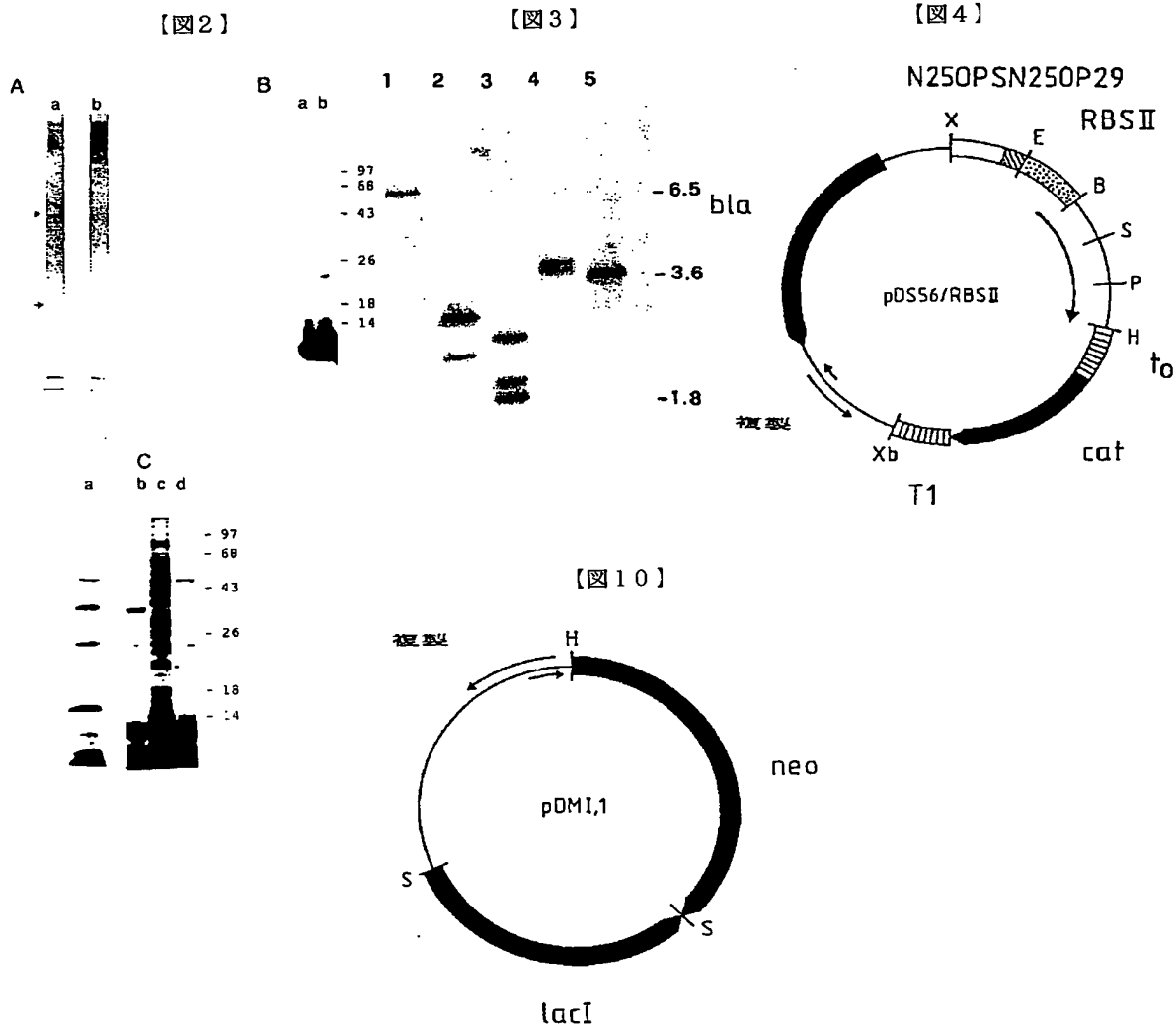
【補正方法】変更

【補正内容】

【図1a】

1 GCTTTTGCCTCGGAGATAGTCGTTGTGTGTTTGC GCGATCACCCGCGAACTTCTCTACCA
61 ACTGAAAATGGCTAAGTCTATGCTTCTGGAATTGTTTTGCTGGTCTTGTGTGCTGCTGC
M A K S M L S G I V F A G L V A A A
121 AGCGGCCAGTTCGGCCAACAGCGCCGCCAACGTCTCCGTTTTGGAGAGTGGGCCCGCTGT
A A S S A N S A A N V S V L E S G P A V
181 GCAGGAAGTGCCAGCGCGCACGGTCACAGCTCGCCTGGCGAAGCCTTTGCTGCTTCTTTC
Q E V P A R T V T A R L A K P L L L S
241 TGCTCTTGCTGCGACTTTGGCAGCAGCTTTCCTCGTTTTGCAATGCTTCAACACCATCTC
A L A A T L A A A F L V L Q C F N T I S
301 CAGCAACAACCAGCFAACCAGCGTCAGGAGACTGGCCGCCGAGGTGCATGCGGAGATGA
S N N Q Q T S V R R L A A G G A C G D E
361 GGAAGATGCAGATGAGGGAACCTTCACAGCAGGCCAGCCGAGGAGAGAAAACCTGATAC
E D A D E G T S Q Q A S R R R R K P D T
421 CCCTGCAGCAGATAAATACGATTTTGTGTGGCGGAACCTCCAGTTTCGGTCACTGAGCCGAA
P A A D K Y D F V G G T P V S V T E P N
481 TGTTGATGAAGTCCTTATCCAAATTAGAAATAAACAATCTTTTGAAGAACCCATGGAC
V O E V L I Q I R N K Q I F L K N P W T
541 TGGACAAGAAGAACAAGTTCTAGTACTGGAACGACAAAGTGAAGAACCCATTCTGATTGT
G Q E E Q V L V L E R Q S E E P I L I V
601 GGCGAGGACAAGACAACACTTGAAGGATATCTTGTAGTCAGCTCTTGCACAGGACGGAA
A R T R Q H L K D I L V V S S C T G R K
661 AGACTGCTAAAGAAAGAGAAAGTTGAAGGAGGCCAAACTCACAAGATATAAAGTCAAGA
D C
721 GCAGCGACCCAGGATATGGATCCCATACACCACGGTGTCTGACGGGGTTCCTGTGGGAA

781 CAGACGAAGACGGATACGTCGTCGAAGTTCTTATGAAAACCGGACCCCATGGAGGAGTCG
841 ACATGATGACTAGCACAGCATCACAAAGGAAAATTCTGCGGAGTGCTTATGGATGACGGAA
901 AAGGAAACCTAGTCGATGGACAAGGGAGAAAAATTACCGCCGTTATCGCATGCTAACTCA
961 ACCGGATACCGAGTTTAGAAGCGGACCAGGAGACGACGAGGACGACGAGTGAGTGAGCGG
1021 AGTTGGCTTTTGTCCCTGTTGATGCCGTTGCCCACTTTCGCAGCTTGCTTGTTCTCTGGG
1081 CTGCGCTGTGCCGCGACATGCGCTTGCGGTTCCGCTGAGTTCTTTCGGACTGTTTAAAC
1141 TTTTAATTCATTTTCTACTGCGGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1194



【図5a】

XhoI
 1 CTCGAGAAAT CATAAAAAT TTATTTCCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT
 51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG
 EcoRI
 BamHI SalI PstI HindIII
 101 AGGAGAAATT AACTATGAGA GGATCGGTGG ACCTGCAGCC AAGCTTAATT
 MetArg GlySerVala spLeuGlnPr oSerLeuIle
 151 AGCTGAGCCTT GGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAACTCC
 Ser
 201 ATCTGGATTT GTTCAGAACG CTCGGTTGCC GCGGGGCGTT TTTZATTGGT
 251 GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAATA
 301 TCGAGAAAAA AATCAGTGGG TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT
 351 CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC ATTTTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATTA
 401 CCAGACCGTT CAGCTGGATA TTACGGCCTT TTAAAGACC GTAAAGAAAA
 451 ATAAGCACAA GTTTTATCCG GCGTTTATTC ACATTCTTGC CCGCCTGATG
 501 AATGCTCATC CGGAATTTGG TATGGCAATG AAAGACGGTG AGCTGGTGAT
 551 ATGGGATAGT GTTACCCCTT GTTACACCGT TTTCCATGAG CAAACTGAAA
 601 CGTTTTATC GCTCTGGAGT GAATACCACG ACGATTTTGG GCAGTTTCTA
 651 CACATATATT CGCAAGATGT GCGGTGTTC GGTGAAAACC TGGCCTATTT
 701 CCCTAAAGGG TTTATTGAGA ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG
 751 TGAGTTTCAC CAGTTTGAT TTAAACGTGG CCAATATGGA CAACTTCTTC
 801 GCGCCCGTTT TCACCATGGG CAAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT
 851 GATGCCGCTG GCGATTCAGG TTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG
 901 TCGGCAGAAAT GCTTAATGAA TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC
 951 GGGGGTAAT TTTTTAAGG CAGTATTTGG TGGCCTTAAA CGCCTGGGGT
 1001 AATGACTCTC TAGCTTGAGG CATCAATAA AACGAAAGGC TCAGTCGAAA
 1051 GACTGGGCCT TTCGTTTAT CTGTTGTTG TCGGTGAACG CTCTCCTGAG
 XbaI
 1101 TAGGACAAAT CCGCCTCTCT AGAGCTGCCT CCGCGGTTTC GGTGATGACG

【図5b】

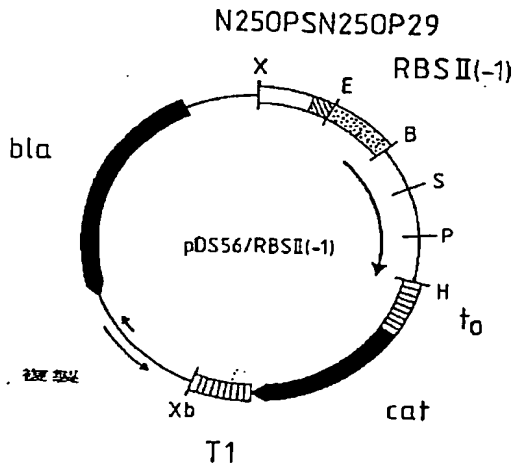
1151 GTGAAACCT CTGACACATG CAGCTCCCGG AGACGGTCAC AGCTTGTCG
 1201 TAAGCGGATG CCGGGAGCAG ACAAGCCCGT CAGGGCCCGT CAGCGGGTGT
 1251 TGGCGGGTGT CCGGGCCGAG CCATGACCCA GTCACGTAGC GATAGCGGAG
 1301 TGTATACTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTCAGAGTGC
 1351 ACCATATCGG GTGTGAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC
 1401 ATCAGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCTG
 1451 TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT
 1501 CCACAGATC AGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG
 1551 CAAAAGCCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCATAG
 1601 GCTCCGCCCC CTTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT
 1651 GGGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC
 1701 TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC
 1751 CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCAATGC TCACGCTGTA
 1801 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCCCT CCAAGCTGGG CTGIGTGCAC
 1851 GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATGCTCT
 1901 TGAGTCCAAC CCGGTAAAGC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG
 1951 GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG
 2001 AAGTGGTGGC CTAACACCG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG
 2051 CGCTCTGCTG AAGCCAGTGA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT
 2101 CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTGT TTGCAAGCAG
 2151 CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC
 2201 TAAGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTAA GGGATTTTGG
 2251 TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCCTTT AAATTA AAAA
 2301 TGAAGTTTGA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG
 2351 TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTG
 2401 GTTCATCCAT AGCTGCCTGA CTCGCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG
 2451 GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA ATGATACCGC GAGACCCAGC

【図5c】

2501 CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG
 2551 AGCGCAGAAG TGSTCCTGCA ACTTATCCG CCTOCATCCA GTCTATTAAT
 2601 TGTTCGCGGG AAGTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTZAATA GTTTCGGCAA
 2651 CGTGTTCGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCAAGCTCG TCGTTTGGTA
 2701 TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC
 2751 CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTOGGTCTC CGATCGTTGT
 2801 CAGAAGTAAG TTGGCCGCGAG TGTATCACT CATCGTTATG GCAGCACTGC
 2851 ATAATTCTCT TACTGTGATG CCATCCGTA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
 2901 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG
 2951 CTCTTGCCCG GGGTCAATAC GGGATAATAC CCGGCCACAT AGCAGAACTT
 3001 TAAAAGTGCT CATCATGGA AAACGTTCTT CCGGCGGAA ACTCTCAAGG
 3051 ATCTEACGCG TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA
 3101 CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA
 3151 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAATGT
 3201 TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGS
 3251 TTATGTCTTC ATGAGCGGAT ACATATTGA ATGTATTAG AAAAATAAAC
 3301 AAATAGGGGT TCCGGGCACA TTCCCGGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA
 3351 GAAACCATA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG
 3401 GCCCTTTGCT CTTCAC

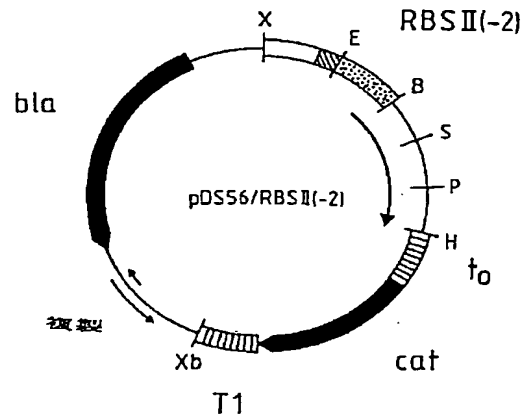
【図6】

図 6



【図8】

N250PSN250P29



【図7a】

```

      XhoI
1  CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT

      EcoRI
51  AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAAG

      BamHI  SalI  PstI  HindIII
101 AGGAGAAATT AACTATGAGG GATCCGTGGA CCTGCAGCCA AGCTTAATTA
      MetArg AspProSerT hrCysSerGI nAla

151 GCTGAGCTTG GACTCCTGTT GATAGATCCA GTAATGACCT CAGAACTCCA
201 TCTGGATTTG TTCAGAACGC TCGGTTCGCG CCGGGCGTTT TTTATTGGTG
251 AGAATCCAAG CTAGCTTGGC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAAT
301 GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC
351 GTAAAGAACAA TTTTGAGGCA TTTCAGTCAG TTGCTCAATG TACCTATAAC
401 CAGACCGTTC AGCTGGATAT TACGGCCTTT TTAAAGACCG TAAAGAAAAA
451 TAAGCACAAG TTTTATCCGG CCTTTATPCA CATTCTTGCC CGCCTGATGA
501 ATGCTCATCC GGAATTTGCT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCCTGGTGATA
551 TGGGATAGTG TTCACCCCTG TTACACCGTT TTCCATGAGC AAAGTGAAAC
601 GTTTTCATCG CTCTGGAGTG AATACCACGA CGATTTCGGC CAGTTTCTAC
651 ACATATATTC GCAAGATGTG GCGTGTACG GTGAAAACCT GGCTATTTTC
701 CCTAAAGGGT TTATGAGAA TATGTTTTTC GTCTCAGCCA ATCCCTGGGT
751 GAGTTTCACC AGTTTIGATT TAAACGTGGC CAATATGGAC AACTTCTTCG
801 CCCCCTTTT CACCATGGGC AAATATTATA CGCAAGGCCA CAAGGTGCTG
851 ATGCCGCTGG CGATTTCAGT TCATCATGCC GTCTGTGATG GCTTCCATGT
901 CGGCAGAAATG CTTAATGAAT TACAACAGTA CTGCGATGAG TGGCAGGGCG
951 GGGCGTAATT TTTTAAGGC AGTTATTGGT GCCCTTAAAC GCCTGGGGTA
1001 ATGACTCTCT AGCTTGAGGC ATCAAAATAA ACGTAAGGCT CAGTCGAAAG
1051 ACTGGGCCTT TCGTTTATC TGTGTGTGT CCGTGAACGC TCTCCTGAGT

      XbaI
1101 AGGACAAATC CGCCCTCTTA GAGCTCCCTC GCGCGTTTCG GTGATGACCG

```

【図7b】

1151 TGA AACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGCTGT
 1201 AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGCGCGTC AGCGGGTGT
 1251 GCGGGTGTG GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT
 1301 GTACTAGGC TTA ACTATGC GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA
 1351 CCATATGCGG TGTGAATAC CGACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA
 1401 TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTGGTCTGT
 1451 CGCTGGCGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC
 1501 CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC
 1551 AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCGCGT TCGTGGCGTT TTTCCATAGG
 1601 CTCGGCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG
 1651 GCGAAACCG ACAGGACTAT AAAGTACCA GCGTTTCCC CCTGGAAGCT
 1701 CCTCGTGGC CTCTCTGT TCGACCTGC CGCTTACCG ATACCTGTCC
 1751 GCTTTCTCC CTGCGGAG CGTGGCGTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG
 1801 GTATCTAGT TCGGTGTAGG TCGTGGCTC CAGCTGGGC TGTGTGCAGC
 1851 AAGCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGGCCT TATCGGTAA CTATGTTCT
 1901 GAGTCCACC CGGTAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG
 1951 TACAGGATT AGCAGAGGGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA
 2001 AGTGGTGGC TAACTACGGC TAACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC
 2051 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGGAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC
 2101 CGGCAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTGT TGAAGCAGC
 2151 AGATTACCG CAGAAAAAA GGATCTCAG AAGATCCTTT GATCTTTCT
 2201 ACGGGGTCTG ACGCTCAGT GAACGAAAC TCACGTAAAG GGATTTTGGT
 2251 CATGAGATTA TCAAAAAGGA TTTTACCTA GATCCTTTTA AATAAAAAT
 2301 GAGTTTAA ATCAATCTA AGTATATATG AGTAACTTG GTCTGACAGT
 2351 TACCAATGCT TAATCACTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTG
 2401 TTAATCCATA GCTGCTGAC TCCCGTGT GTAGATAACT ACGATAAGG
 2451 AGGCTEACC ATCTGCCCC AGTCTGCAA TGATACCGG AGACCCAGC

【図7c】

2501 TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATTAAC CAGCCAGCCG GAAGGGCCGA
2551 GCGCAGAAGT GGTCCCTGCA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT
2601 GTTCCCGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTGCG CAGTTAATAG TTTGCCCAAC
2651 GTTGTGCCA TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCAOGCTGCT CGTTTGGTAT
2701 GGCTTCATC AGCTCCGGTT CCCAACGATC AAGGOGAGTT ACATGATCCC
2751 CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCTCC GATCGTTGTC
2801 AGAAGTAAGT TGGCCGCGT GTTATCACTC ATGTTTATGS CAGCACTGCA
2851 TAATCTCTT ACTGTATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG
2901 AGTACTCAAC CAGTTCATC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC
2951 TCTTGCCCGG CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT
3001 AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AAGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA
3051 TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTGATGT AACCCACTCG TGCACCCAAC
3101 TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGGGT GAGCAAAAAC
3151 AGGAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAATGTT
3201 GAATACTCAT ACTTTTCTT TTTCAATAIT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT
3251 TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA
3301 AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG
3351 AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACCAGG
3401 CCCTTTCGTC TTCAC

【図9a】

図 9 a

XhoI
 1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT
 EcoRI
 51 AATAGATTCA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG
 BamHI Sali PstI HindIII
 101 AGGAGAAATT AACTATGAGG ATCCGTGAC CTGCAGCCAA GCTTAATTAG
 MetArg IleArgArgP roAlaAlaLy sLeuAsn
 151 CTGAGCTTGG ACTCCTGTTG ATAGATCCAG TAATGACCTC AGAAGTCCAT
 201 CTGATTTGT TCAGAACGCT CGGTGCGGC CGGGCGTITT TTATGGTGA
 251 GAATCCAAGC TAGCTTGGCG AGATTTTCAG GAGCTAAGGA AGCTAAAATG
 301 GAGAAAAAA TCACTGGATA TACCACCGTT GATATAATCC AATGGCATCG
 351 TAAAGAACAT TTGAGGCAT TTCAGTCACT TGCTCAATGT ACCTATAACC
 401 AGACCGTTCA GCTGGATATT ACGGCTTTT TAAAGACCGT AAAGAAAAAT
 451 AAGCACAAGT TTTATCCGGC CTTTATTCAC ATTCTTGCCC GCCTGATGAA
 501 TGCTCATCGG GAATTTCGTA TGGCAATGAA AGACCGTGAG CTGGTGATAT
 551 GGGATAGTGT TCACCTTGT TACACCGTIT TCCATGAGCA AACTGAAACG
 601 TTTTCATCGC TCTGGAGTGA ATACCAACGAC GATTTCGGC AGTTTCTACA
 651 CATATATTGG CAAGATGTGG CGTGTACGG TGAAAACCTG GCCTATTTCG
 701 CTAAGGGTIT TATTGAGAAT ATGTTTTTCG TCTCAGCCAA TCCCTGGGTG
 751 AGTTTCACCA GTTTGATTT AAACGTGGCC AATATGGACA ACTTCTTCGC
 801 CCCCGTTTTC ACCATGGGCA AATATTATAC GCAAGGCGAC AAGGTGCTGA
 851 TGCCGCTGGC GATTCAAGTT CATCATGCCG TCTGTGATGG CTTCATGTC
 901 GGCAGAATGC TTAATGAATT ACAACAGTAC TGGATGAGT GGCAGGGCGG
 951 GGCCTAATTT TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG CCTGGGGTAA
 1001 TGACTCTCTA CCTTGAGGCA TCAAATAAAA CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA
 1051 CTGGGCTTT CGTTTATCT GTTGTGTGTC GGTGAACGCT CTCTGAGTA
 XbaI
 1101 GGACAAATCC GCCGCTCTAG AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT

【図9b】

1151 GAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTGTCTGTGA
 1201 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG
 1251 GCGGGTGTG GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGAGTGT
 1301 TATACTGGCT TAACATGCG GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC
 1351 CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT
 1401 CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTGCTGCGC TCGGTCTGTC
 1451 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTATCC
 1501 ACAGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGCCAGCA
 1551 AAAGGCCAGG AACCGTAAAA AGGCGCGGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC
 1601 TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG
 1651 CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC
 1701 CCTGTGCGC TCTCTGTTC CGACCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG
 1751 CCTTCTCCC TCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATGCTC ACGCTGTAGG
 1801 TATCTAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA
 1851 ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGGCCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG
 1901 AGTCCAACCC GGTAAAGACAC GACTATGCG CACTGGCAGC AGCCACTGGT
 1951 AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA
 2001 GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG
 2051 CTCTGCTGAA GTCAGTACC TTGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC
 2101 GGCAACAAA CCAACGCTGG TAGCGGTGGT TTTTGTGTT GCAAGCAGCA
 2151 GATTACGGC AGAAAAAAG GATCTAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA
 2201 CCGGGTCTGA CCTCAGTGG AACGAAACT CACGTAAAG GATTTTGGTC
 2251 ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG
 2301 AAGTTTAAA TCAATCTAAA GATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT
 2351 ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG
 2401 TCATCCATAG CTGCTGACT CCGGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA
 2451 GGGCTACCA TCTGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCA GACCCAGCT

[図9c]

図 9 c

2501 CACCGGCTCC AGATTATCA GCAATAAAC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG
2551 CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
2601 TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTAAATAGT TTGCCCAACG
2651 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG
2701 GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC
2751 CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCCT CGGTCCCTCG ATCGTTGTCA
2801 GAAGTAAGTT GCGCCGAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCGAT
2851 AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA
2901 GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT
2951 CTGCCCCGGC GTCAATACGG GATAATAACG OCCCACATAG CAGAACTTGA
3001 AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTGG GGGGAAAAC TCTCAAGGAT
3051 CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT
3101 GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA
3151 GGAAGGCAAA ATGCGGCAAA AAAGGGAATA AGGGGACAC GGAAATGTTG
3201 AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT
3251 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTGAAT GTATTAGAA AAATAAACAA
3301 ATAGGGGTTC CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA
3351 AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGAGGC
3401 CCTTTGGTCT TCAC

【図11a】

HindIII

```

1  AAGCTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAAGGAAG
51  CGGAACACGT AGAAGCCAG TCCGCAGAAA CGGTGCTGAC CCGGATGAA
101 TGTCAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA
151 AGCAGGTAGC TTGAGTGGG CTTCATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT
201 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA
251 GGTGGGAAG CCCTGCAAAG TAACTGGAT GGCTTCTTG CCGCCAAGGA
301 TCTGATGGCG CAGGGATCA AGATCTGATC AAGAGACAGG ATGAGGATCG
351 TTTGCGATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGCTTG
      Met
401 GGTGGAGAGG CTATTGGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
451 CTGATGCGCG CGTGTTCGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTCTTTTTT
501 GTCAAGACCG ACCGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC
551 GCGGCTATCG TGGCTGGCCA CGACGGGGT TCTTGCGCA GCTGTGCTCG
601 ACGTTGTAC TGAAGCGGA AGGACTGGC TGCTATTGGG CGAAGTCCCG
651 GGGCAGGATC TCTGTATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT
701 CATGGCTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCGG GCTACCTGCC
751 CATTGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGG TACTCGGATG
801 GAAGCCGGTC TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT
851 CGCGCCAGCC GAACTGTTCG CCAGGCTCAA GCGCGGCATG CCGGACGGCG
901 AGGATCTCGT CGTGACCCAT GCGATGCCT GCTTGCCGAA TATCATGGTG
951 GAAATGGCC GCCTTCTGG ATTCATGAC TGTGGCCGGC TGGGTGTGGC
1001 GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1051 TTGGGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTACGG TATCGCCGCT
1101 CCGATTGCG AGGCGATCGC CTTCTATCGC CTCTTGACG AGTTCTTCTG
      Phe
1151 AGCGGGACTC TGGGTTGGA AATGACCGAC CAAGCGACGC CCAACCTGCC

```


【図11b】

1201 ATCACGAGAT TTCGATTCCA CCGCGCGCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
1251 GAATCGTTTT CCGGGACGCC GGCTGGATGA TCTCCAGCG CCGGGATCTC
1301 ATGCTGGAGT TCTTCGCCCA CCGCGGCTC GATCCCCCTCG CGAGTTGGTT
1351 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACGACCTCGC GGAGTTCTAC CCGCAGTGCA
1401 AATCCGTCGG CATCCAGGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC
1451 CCGAAGTGC AGGAGTGGGG AGGCAGATG GCGGCTTTGG TCGACAATTC
1501 GCGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGCT TTCCAGTOGG
(Gln)
1551 GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAATGAA TCGGCCAAG CCGCGGAGAG
1601 GCGGTTTGC GTATTGGGCG CCAGGTGGT TTTCTTTTC ACCAGTGAGA
1651 CCGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGCT GCGCCTGAGA GAGTTGCAGC
1701 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCCCAGCAGG CGAAATCCT GTTTGATGGT
1751 GGTAAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGTATCCCA
1801 CTACCGAGAT ATCCGCACCA ACGCGCAGCC CGGACTCGGT AATGGCGGCG
1851 ATTGCGCCCA GCGCCATCTG ATCGTTGGCA ACCAGCATCG CAGTGGGAAC
1901 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATGGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
1951 TCCAGTCGCC TTCCGTTCC GCTATCGGCT GAATTGATT GCGAGTGAGA
2001 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACGCAGACGC GCGAGACAG AACTTAATGG
2051 GCGCGTAAC AGCGGATTT GCTGGTGACC CAATGCGACC AGATGCTCCA
2101 CCGCCAGTCG CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
2151 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AATAACGCC GGAACATTAG TGCAGGCAGC
2201 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTATCCAG CGGATAGTGA ATGATCAGCC
2251 CACTGACGCG TTGCGCGAGA AGATTGTGCA CCGCGGCTTT ACAGGCTTCG
2301 ACGCGGCTTC GTTCTACCAT CGACACCACC ACGTGGCAC CCAATTGATC
2351 GCGCGGAGAT TTAATCCCG CGACAATTG CGACGGGCGG TGCAGGGCCA
2401 GACTGGAGGT GGCAACGCA ATCAGCAACG ACTGTTTCCC CCGCAGTTGT

【図11c】

2451 TGTGCCACGC GGTGGGAAT GTAATTCAGC TCCGCCATCG CCGCTTCCAC
 2501 TTTTTCCTCG GTTTTCGAG AACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACCGGG
 2551 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATCT CTGGACATC GTATAACGTT
 2601 ACTGGTTTCA CATTACCCAC CTTGAATGA CTCTCTCCG GCGCTATCA
 (Me t)
 2651 TGCCATACCG CGAAGGTTT TGCACCATTC GATGGTGTC ACGTAAATGC
 Sali
 2701 ATGCCGCTTC GCCTTCGCG GGAATGTG GACCTGTCC CTCCTGTCA
 2751 GCTACTGACG GGGTGGTGG TAACGGCAA AGCACCGCG GACATCAGCG
 2801 CTAGCGGAGT GTATCTGGC TTTACTATGTT GGCCTGATG AGGGTGTCAG
 2851 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAG GCTGCACCG TCGTCAGCA
 2901 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTAC
 2951 GCTCGGTCTG TCGACTGCG CGAGCGGAA TGGCTTACGA ACGGGCGGA
 3001 GATTTCTCG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACCGGAAG TGAGAGGGCC
 3051 GCGGCAAGC CGTTTTTCCA TAGGCTCCG CCCCCTGACA AGCATCACGA
 3101 AATCTGACGC TCAAATCAGT GGTGGCGAA CCGACAGGA CTATAAGAT
 3151 ACCAGGCGTT TCCCTGGCG GCTCCCTCGT GCGCTCTCT GTCTGCTT
 3201 TTGGTTTAC CGGTGTCATT CCGCTGTAT GGCCTGCTT GTCTCATTC
 3251 ACGCTGACA CTCAGTTCCG GGTAGGCAGT TCGCTCCAAG CTGGACTGA
 3301 TGCACGAACC CCCCCTTCAG TCCGACCGCT GCGCTTATC CGGTAACTAT
 3351 CGTCTTGAAT CCAACCCGA AAGACATGCA AAAGCACCAC TGGCAGCAGC
 3401 CACTGGTAAT TGATTTAGAG GAGTASTCT TGAAGTCATG CCGCGTTAA
 3451 GGCTAACTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TCGCTCTCT CAGCCAGTT
 3501 AACTCGGTT AAAGAGTTG TAGCTCAGAG AACCTTCGAA AAACCGCCT
 3551 GCAAGGCGGT TTTTCTGTT TCAGAGCAAG AGATTACCG CAGACCAAA
 3601 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAATATT TCTAGATTTC
 3651 AGTGCAATT ATCTCTCAA ATGTAGCACC TGAAGTCAG CCCATACGAT
 3701 ATAAGTTGTT AATCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

 フロントページの続き
(51)Int.Cl.³

C 1 2 N 15/30

C 1 2 P 21/02

//C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

識別記号

Z N A

庁内整理番号

C 8214-4B

F I

技術表示箇所

(47)

特開平6-172396

C12R 1:19)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)